

Aus der Professur für Tiergesundheit und Tierschutz
der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät

**Entwicklung eines Lateral Flow Assays zum Nachweis von Salmo-
nellen auf Grundlage von Antikörpern gegen Peptide des
Effektorproteins SipC des Typ III Sekretionssystems von
Salmonella spp.**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Agrarwissenschaften (doctor agriculturae (Dr. agr.))

an der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von Dipl. Ing (FH) Heike Fahlandt
aus Papendorf

Rostock, den 13.06.2016

1. Gutachter: Prof. Dr. Elmar Mohr
2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Oehlenschläger
3. Gutachter: Prof. Dr. Karl Steffens

Datum der Einreichung: 22.09.2015

Datum der Verteidigung: 20.05.2016

Danksagung

Nach Jahren intensiver Arbeit liegt meine Dissertation vor Ihnen, womit es an der Zeit ist, mich bei den Menschen zu bedanken, die mich in dieser herausfordernden, aber auch lohnenden Phase meiner akademischen Laufbahn begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. Mohr für die zurückhaltende, aber immer zielgerichtete Betreuung meiner Arbeit, seine wertvollen Anregungen und seine jederzeit offene Tür.

Herrn Professor Dr. Oehlenschläger und Herrn Professor Dr. Steffens danke ich sehr für die Übernahme der Koreferate.

Ein großer Dank geht an Dr. Udo Meyer für die Möglichkeit, die Dissertation zu einem anspruchsvollen und interessanten Thema in seinem Unternehmen anfertigen zu dürfen und für seine stete Unterstützung, nicht zuletzt finanzieller Art.

Besonders meinen Kollegen danke ich vielmals, denn die Zusammenarbeit mit ihnen war ein Meilenstein bei der Erstellung meiner Doktorarbeit. Sie haben mich mit ihrer Hilfe, ihren Tipps und wertvollen Diskussionsbeiträgen immer wieder auf neue Pfade gelenkt und den Rücken zum Schreiben freigehalten. Ohne ihr Wissen, ihre Ideen und ihre Kritik hätte ich sicherlich nicht das geleistet, was ich nun geschafft habe.

Nicht minder aufreibend waren die vergangenen Jahre für meine Familie, die diese Arbeit mit Interesse bedacht und mir immer wieder Kraft zum Durchhalten in schwierigen Situationen gegeben hat. Ihnen gilt mein von Herzen kommender Dank.

Verzeichnisse

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnisse	1
1 Einleitung und Zielsetzung.....	10
2 Literaturübersicht	13
2.1 Salmonella	13
2.1.1 Taxonomie und Nomenklatur	13
2.1.2 Morphologie und charakteristische Merkmale der Salmonellen	15
2.1.3 Infektionswege.....	16
2.1.4 Pathogenese	18
2.1.4.1 Salmonelleninfektionen beim Menschen	18
2.1.4.2 Salmonelleninfektionen beim Nutztier	20
2.1.4.3 Pathogenitätsfaktoren	22
2.1.5 Methoden der Diagnostik.....	24
2.2 SipC	26
2.2.1 Aufbau und Bildung bei Kontakt mit der Wirtszelle	26
2.2.2 Aufgaben bei der Zellinvasion	28
2.3 Lateral Flow Assay.....	30
2.3.1 Einordnung der Lateral Flow Assays innerhalb der Immunoassays	30
2.3.2 Aufbau eines nicht kompetitiven LFA	32
2.3.3 Funktionen der Einzelkomponenten	34
2.3.3.1 Sample Pad.....	34
2.3.3.2 Conjugate Pad.....	34
2.3.3.3 Membran	35
2.3.3.4 Absorbent Pad.....	36
2.3.3.5 Marker	36
2.3.3.6 Antikörper	37
3 Material und Methoden	38
3.1 Material	38
3.1.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	38
3.1.2 Chemikalien und Fertigmedien.....	40

3.1.3	Puffer, Lösungen, Nährmedien und Gele	41
3.1.4	Bakterienstämme.....	43
3.1.5	Antikörper	44
3.2	Methoden	44
3.2.1	Präparation des Antigens	44
3.2.2	Herstellung polyklonaler Antikörper	46
3.2.2.1	Injektion der Antigene.....	46
3.2.2.2	Präparation der Seren	46
3.2.3	Affinitätsreinigung der AK aus dem Serum.....	46
3.2.3.1	Protein A Säule	47
3.2.3.2	Spezifische Aufreinigung des IgG über SulfoLink® Säule.....	48
3.2.4	Antikörpercharakterisierung.....	49
3.2.4.1	Proteinbestimmung	49
3.2.4.2	Nachweis der spezifischen Bindung der pAK.....	49
3.2.4.2.1	Dot Blot.....	49
3.2.4.2.2	Western Blot	50
3.2.4.2.3	Nachweis der spezifischen Bindung der pAK mittels ELISA.....	52
3.2.5	Produktion monoklonaler Antikörper.....	53
3.2.6	Voranreicherung der Bakterienkulturen für den Dot Blot	54
3.2.7	Voranreicherung der Bakterienkulturen für ELISA zum Nachweis der Sezernierung von SipC in Voranreicherungsmedien.....	54
3.2.8	Voranreicherung der Bakterienkulturen für den LFA zum Nachweis von Salmonellen aus Kulturüberständen	54
3.2.9	ELISA zum Nachweis der Sezernierung von SipC in Voranreicherungsmedien	55
3.2.10	LFA zum Nachweis von Salmonellen aus Kulturüberständen.....	56
3.2.10.1	Blotting der Membran und Zusammenfügen der Einzelkomponenten.....	56
3.2.10.2	Testdurchführung	57
4	Ergebnisse.....	58
4.1	Eignung der Antikörper	58
4.1.1	Isolierung der Antikörper	58
4.1.2	Dot Blot und Western Blot	59

4.1.3	ELISA zum Nachweis der spezifischen Bindung an Salmonellenproben	62
4.2	ELISA zum Nachweis der Sezernierung von SipC in Voranreicherungsmedien.....	64
4.3	LFA zum Nachweis von Salmonellen aus Kulturüberständen.....	66
5	Diskussion	69
5.1	Quantität und Qualität der polyklonalen Antikörper.....	69
5.2	ELISA zum Nachweis der Sezernierung von SipC in Voranreicherungsmedien.....	72
5.3	LFA zum Nachweis von Salmonellen aus Kulturüberständen.....	74
6	Ausblick	81
7	Zusammenfassung.....	82
8	Summary.....	85
9	Literaturverzeichnis	88
10	Anhang.....	99

Abkürzungsverzeichnis

ad.	addiere
AK	Antikörper
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APS	Ammoniumpersulfat
ARP	Actin Related Protein
AS	Aminosäure(n)
ATCC	American Type Culture Collection
a_W -Wert	Wasseraktivität (Maß für das „verfügbare“ oder „aktive“ Wasser)
bidest.	Bidestilliert
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Caso	Casein-Soja-Pepton-Bouillon
CDC	Cell Division Cycle
CM	Cytoplasmic Membrane
DIN	Deutsches Institut für Normung
DANN	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
D-Wert	dezimale Reduktionszeit
EG	Europäische Gemeinschaft
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
EU	Europäische Union
et al.	et alii (und andere)
etc.	et cetera (und weitere)
Fa.	Firma
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
ggf.	gegebenenfalls
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GN-Bouillon	Gramnegativ-Bouillon

GPW	gepuffertes Peptonwasser
ICSP	International Committee on Systematics of Prokaryotes
i.d.R.	in der Regel
IgG	Immunglobulin G
Inv	Invasion protein
Ipa	invasion plasmid antigen (Invasions-Plasmidantigen)
KbE	Kolonie bildende Einheiten
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
KVP	Konjugat Verdünnungspuffer
LB	Lactose-Bouillon
LFA	Lateral Flow Assay (Querfließtest)
LPS	Lipopolysaccharid
mAK	monoklonaler Antikörper
mind.	mindestens
MMB	Magermilch mit Brillantgrün
MMP	Magermilchpulver
NB	Nährbouillon
NK	Negativkontrolle
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
OM	Outer Membrane
OVA	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PBS/T	phosphate buffered saline with Tween 20 (Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween 20)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PGN	Peptidoglucane
pH	pH-Wert (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-ionenkonzentration)
pI	isoelektrischer Punkt
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIA	Radioimmunoassay

RiB	Ringerlösung mit Brillantgrün
RKI	Robert Koch Institut
RSA	Rinderserumalbumin
RT	Raumtemperatur
S.	<i>Salmonella</i>
SD	Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SE	Sensitivität
ser.	Serovarietät oder Serovar
Sip	<i>Salmonella</i> invasion protein (<i>Salmonella</i> Invasionsprotein)
sog.	sogenannt
SP	Spezifität
SPI	<i>Salmonella</i> Pathogenitätsinsel
spp.	<i>Species pluralis</i> (Subspezies)
subsp.	Subspezies
T3SS	Typ III Sekretionssystem
TBS	Tris buffered saline (Tris gepufferte Salzlösung)
TBS/T	Tris buffered saline with Tween 20 (Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Trishydroxylmethylaminomethan
TTSS	Typ III Sekretionssystem
U	Umdrehungen
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VO	Verordnung
WB	Brillantgrün mit Wasser
WHO	World Health Organisation
WHOCC-Salm	WHO Collaborating Centre for Reference and Research on <i>Salmonella</i>
WP	Waschpuffer
x_K	Mittelwert des Blanks
x_n	Mittelwert
z.B.	zum Beispiel

Aminosäuren

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anzahl der Serovaren in jeder Art und Unterart.....	14
Tabelle 2: Tenazität von Salmonellen in Abhängigkeit der Matrix	17
Tabelle 3: Verwendete Geräte.....	38
Tabelle 4: Verwendete Materialien	39
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Fertigmedien	40
Tabelle 6: Verwendete Puffer, Lösungen, Medien und Gele	41
Tabelle 7: Ausgewählte Prüfstämme zum Nachweis der Sezernierung von SipC in Vor-anreicherungsmedien	43
Tabelle 8: Verwendete Antikörper	44
Tabelle 9: ELISA-Pipettierschema zum Nachweis der spezifischen Bindung der pAK P2 bis P5 an Kulturüberständen.....	53
Tabelle 10: Pipettierschema zum Nachweis der Sezernierung von SipC in Kultur- überstände mittels ELISA.....	56
Tabelle 11: Extinktionen im indirekten ELISA zum Nachweis der spezifischen Bindung der pAK P2 bis P5 an Kulturüberstände.....	63
Tabelle 12: Nachweis von SipC aus Kulturüberständen unterschiedlicher Nährmedien.....	65
Tabelle 13: Übersicht der Ergebnisse der LFA mit mAK gegen P1, P2, P3 und gesamt SipC.....	67

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell eines Typ III Sekretionssystems von <i>Salmonella enterica</i>	23
Abbildung 2: Aminosäurefrequenz des SipC-Proteins von <i>Salmonella ser.</i> Typhimurium	27
Abbildung 3: Salmonellen-Infektion	28
Abbildung 4: Transmissions-Elektronen-Mikrograph von natürlichem F-Aktin und gebündelter Filamente durch Zugabe von Sip-C	29
Abbildung 5: Einteilung von Immunoassays nach der Form des Gesamtsystems	31
Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines Lateral-Flow-Tests	32
Abbildung 7: Darstellung eines LFA in einem Kunststoffgehäuse am Beispiel des Singlepath® <i>Salmonella</i> Tests der Firma Merk KGaG	33
Abbildung 8: Anordnung der ausgewählten Peptidsequenzen im SipC-Protein	45
Abbildung 9: Peptid-Immobilisierung mittels SulfoLink® Kopplungsreagenzien	48
Abbildung 10: Elutionsdiagramm der Protein A Säule	58
Abbildung 11: Dot Blot der pAK gegen P1 in verschiedener Verdünnung	59
Abbildung 12: Dot Blot der pAK gegen P2 in verschiedener Verdünnung	59
Abbildung 13: Dot Blot der pAK gegen P3 in verschiedener Verdünnung	60
Abbildung 14: Dot Blot der pAK gegen P4 in verschiedener Verdünnung	60
Abbildung 15: Dot Blot der pAK gegen P5 in verschiedener Verdünnung	60
Abbildung 16: Western Blot des pAK gegen P1	61
Abbildung 17: Dot Blot (Doppelbestimmung) des AK-Pool aus pAK P1 bis pAK P5 in verschiedenen Verdünnungen anhand von Kulturüberständen	62
Abbildung 18: Versuch 2; LFA-Aufbau zum Nachweis von SipC	68
Abbildung 19: Versuch 4; LFA-Aufbau zum Nachweis von SipC	68
Abbildung 20: Versuch 8; LFA-Aufbau zum Nachweis von SipC	68

1 Einleitung und Zielsetzung

In Deutschland werden jährlich ca. 550 Mio. Tiere geschlachtet, als Frischware vermarktet oder als Fleischerzeugnis weiterverarbeitet (FRIES, 2012). Die großtechnische Gewinnung von Fleisch bringt dabei technische Vorteile, birgt jedoch hygienisch auch Risiken. So kann die Schlachtung klinisch unauffälliger, jedoch infizierter Tiere zu einem Eintrag von Keimen in die Lebensmittelkette führen (HARLIZIUS, 2012).

Salmonellosen zählen dabei weltweit zu den häufigsten bakteriellen Infektionskrankheiten und stellen derzeit die zweithäufigste gemeldete Zoonose beim Menschen in der Europäischen Union mit insgesamt 95548 bestätigten Erkrankungen aus 27 Mitgliedsstaaten dar (EFSA, 2013). Die European Food Safety Authority EFSA (2011) schätzt die allgemeine wirtschaftliche Belastung durch humane Salmonellosen auf über 3 Milliarden Euro pro Jahr.

Neben dem hohen Fleischkonsum, der laut MRI (2008) in Deutschland bei 19,3 kg pro Jahr (Frauen) bis zu 37,6 kg pro Jahr (Männer) liegt, sieht CORK (2011) eine Ursache für die schnelle und weite Verbreitung von Salmonellen in der Organisation des Lebensmittelhandels. Zudem stehen Salmonellen aufgrund ihrer Persistenz in der Umwelt in Kombination mit ihrer Virulenz und Anpassungsfähigkeit im Fokus der öffentlichen Gesundheit.

Aufgrund der Vielzahl von Krankheitsfällen sowie aus Verbraucherschutzgründen besteht nach wie vor ein hoher Bedarf an schnellen und sicheren Verfahren zum Nachweis von Salmonellen. Die klassische Labordiagnostik der Salmonellosen beruht auf der Anzucht der Erreger aus dem Probenmaterial und ihrer Einordnung als Salmonellen-Verdachtsfall mit Hilfe von omni- bzw. polyvalenten Salmonellen-Suchseren. Dazu erfolgt zunächst eine Voranreicherung, gefolgt von einer Anreicherung, einer selektiven Kultivierung bis schließlich verdächtige Kulturen identifiziert werden (BAUMGART und BECKER, 1994). Im besten Fall werden für den definitiven Nachweis einer Salmonellen-Infektion 3...5 Tage benötigt. Insbesondere bei Salmonellosen, die durch kontaminierte Lebensmittel hervorgerufen werden, stellt der lange Zeitraum bis zur Diagnose ein großes Problem dar, weil sich zwischenzeitlich weitere Personen infizieren können. Zudem ist die Methodenkaskade sehr materialaufwendig.

Es existiert daher bereits eine Vielzahl alternativer Nachweisverfahren, die jedoch mit unterschiedlich profilierten Einschränkungen verbunden sind. So können nicht alle Salmonellen-Serovaren zuverlässig nachgewiesen werden, teilweise sind zusätzliche Bestätigungen notwendig, es kommt zu falsch-negativen oder falsch-positiven Ergebnissen, es kann nicht zuverlässig zwischen einer akuten oder bereits überwundenen Infektion unterschieden werden, es besteht nur bedingte Praxistauglichkeit aufgrund hoher Kosten und eingeschränkter Nutzungsmöglichkeiten durch eine diesbezüglich geringe Anzahl an Labordienstleistern.

Die entwickelte Methode soll daher möglichst alle Salmonellen-Serovaren bei gleichzeitig einfacher, schneller und kostengünstiger Anwendung nachweisen. Das Testsystem muss sich dazu auf eine Eigenschaft von Salmonellen stützen, die allen Serovaren gemein ist.

Salmonellen geben unter In-vitro-Kulturbedingungen unterschiedliche Proteine in das umgebende Medium ab. Eines dieser Proteine ist das SipC-Protein, das im Zusammenhang mit dem Typ-III-Sekretionssystem sowohl als membranverankertes Translokations- als auch als in die Wirtszelle transloziertes Effektorprotein agiert (SRIKANTH et al., 2011; SCHERER et al., 2000; ZIGANGIROVA et al., 2012). Die Nukleotidsequenz des SipC-Gens ist bekannt und steht über Gen-Datenbanken zur Verfügung. Das von unterschiedlichen gramnegativen Bakterien genutzte Typ-III-Sekretionssystem ähnelt sich im Aufbau, jedoch sind die sezernierten Effektorproteine spezifisch für die jeweilige Spezies. Bei dem SipC-Protein handelt es sich um ein sehr konserviertes Molekül, das heißt, die Aminosäure-Sequenzen verschiedener Salmonellen-Serovaren weisen nur geringe Unterschiede auf. Zudem ist der genetische Unterschied zu Proteinen anderer Spezies mit ähnlicher Funktion (z.B. Effektorprotein IpaC der *Shigella* ssp.) recht hoch, die Sequenzidentität der Salmonellen-Sip-Proteine mit den Shigellen-Ipa-Proteinen reicht von nur 25 % (SipA gegenüber IpaA) bis zu 40 % (SipD gegenüber IpaD, dazwischen SipC gegenüber IpaC) (SUÁREZ und RÜSSMANN, 1998; GALÁN, 1996).

Durch Recherchen bei der Weltorganisation für geistiges Eigentum (englisch World Intellectual Property Organization) konnten Forschungsarbeiten mit dem SipC-Protein ausfindig gemacht werden (SCHUTZRECHT WO/2007/016912; SCHUTZRECHT EP 1 913 394 B1). So ist die Verwendung von PCR-Primern und FRET-Hybridisierungs sonden gegen das SipC-Gen zum Nachweis von Salmonellen be-

kannt. Der Einsatz des SipC-Proteins zu demselben Zweck, insbesondere der Einsatz von Antikörpern gegen das SipC-Protein, wird nicht angedacht. Aus den Druckschriften WEINRAUCH et al. (2002) und HAYWARD et al. (1999) ist die Verwendung von polyklonalen Antikörpern gegen das SipC-Protein zu dessen Nachweis im Immunoblot beschrieben. Die verwendeten polyklonalen Antikörper sind jedoch nicht monospezifisch für Salmonellen und daher nicht für einen spezifischen Salmonellen-Nachweis - wie er vor allem in der Human-Diagnostik und Lebensmittelprüfung erforderlich ist - geeignet.

Dieses SipC-Protein stellt die Grundlage der vorliegenden Arbeit zur Entwicklung eines Testsystems für den immunologischen Nachweis von vorhandenen Salmonelleninfektionen bzw. -kontaminationen dar. Ziel ist es, alle Salmonellen-Serovaren nachweisen zu können und dabei gegenüber bereits am Markt befindlicher Methoden eine Verbesserung im Hinblick auf die Schnelligkeit und die Anwenderfreundlichkeit zu erreichen. Dazu soll auf Basis monoklonaler Antikörper ein Lateral Flow Assay aufgebaut werden, mit dem der Nachweis des SipC-Proteins in einer Probe als Indikator für die Anwesenheit von Salmonellen gelingt. Die Entwicklung schließt dabei die Probenvorbereitung als ausschlaggebenden Faktor für das schnelle Vorliegen eines Testergebnisses ein.

2 Literaturübersicht

2.1 *Salmonella*

2.1.1 Taxonomie und Nomenklatur

Der Erreger des Typhus abdominalis beim Menschen wurde als ein Vertreter der Gattung *Salmonella* erstmals 1880 von Karl Joseph Eberth beschrieben, 1884 gelang Georg Gaffky die Züchtung in Reinkultur. Der nordamerikanische Bakteriologe Daniel Elmer Salmon, nach dem das Genus *Salmonella* benannt wurde, fand im Jahr 1885 den Erreger der Schweinecholera, später *Salmonella choleraesuis* genannt. Nach und nach gelangen verschiedensten Wissenschaftlern immer weitere Beobachtungen und Feststellungen im Zusammenhang mit *Salmonella*-Bakterien. Es folgte eine ganze Reihe von Tierkrankheiten, bei denen die Erreger in ihren Grundeigenschaften übereinstimmten, sich aber serologisch unterschieden. (DRÄGER, 1951; ANANTHANARAYAN und PANIKER, 2010; HAHN et al, 2009)

Ursprünglich wurden Subspezies (ssp.) als Subgenera und Serovaren als Speziesbezeichnung verwendet. Daher stammen die Bezeichnungen Subgenera I (*S. enterica* ssp. *enterica*), II (*S. enterica* ssp. *salamae*), III (ehemals Genus *Arizona*; unterteilt in IIIa, *S. enterica* ssp. *arizonae* und IIIb, *S. enterica* ssp. *diarizonae*), IV (*S. enterica* ssp. *houtenae*), V (*S. bongori*) und VI (*S. enterica* ssp. *indica*). Die Art der Bezeichnung der Serovaren veränderte sich im Laufe der Zeit. Sie wurden nach klinischen Gesichtspunkten (Krankheitssymptom, infizierte Wirtsspezies), nach geographischer Herkunft der erstmaligen Isolierung oder nach der Serologie auf Grund der Variation der Oberflächenantigene (O- und Vi-Antigene) und Flagellenantigene (H-Antigene) nach dem White-Kauffmann-Le Minor-Schema (ehemals Kauffmann-White-Schema) benannt. (GRIMONT und WEILL, 2007)

In den 1980er Jahren wurden die verschiedenen *Salmonella* spp. in einer einzigen Spezies *Salmonella enterica* zusammengefasst und die historischen Subgenera als Subspeziesbezeichnungen übernommen (LE MINOR und POPOFF, 1987). Aufgrund von Typisierungsergebnissen mittels Multilocus-Enzym-Elektrophorese und DNA-Sequenzvergleichen von nicht-regulierten und Invasionsgenen wurde die Gattung *Salmonella* in zwei Spezies, *S. bongori* und *S. enterica*, unterteilt. Letztere gliedert sich wiederum in die taxonomischen Gruppen I, II, IIIa, IIIb, IV und VI, während *S. bongori* die frühere Subspezies V beinhaltete. (REEVES et al., 1989). Es wurde eine

Hypothese zu einer weiteren Gruppe VII aufgestellt, die von der Unterart IV abstammen schien (BOYD et al., 1996). Unter Berücksichtigung der taxonomischen Interpretationen von LE MINOR und POPOFF (1987) und REEVES et al. (1989) wurde im Jahr 2005 letztendlich die in Tabelle 1 dargestellte Nomenklatur als „Opinion 80“ durch die Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes (ICSP) veröffentlicht. TINDALL et al. (2005) verweist jedoch darauf, dass die Nomenklatur einiger Stämme, die bereits vor 1987 erstbeschrieben und im Bakteriologischen Code gelistet wurden, weiterhin gültig ist.

Tabelle 1: **Anzahl der Serovaren in jeder Art und Unterart** (GRIMONT und WEILL, 2007; TINDALL et al., 2005)

Art	Gruppe	Unterart	Anzahl Serovare
<i>S. enterica</i>	I	<i>enterica</i>	1531
	II	<i>salamae</i>	505
	IIIa	<i>arizonae</i>	99
	IIIb	<i>diarizonae</i>	336
	IV	<i>houstenae</i>	73
	VI	<i>indica</i>	13
<i>S. bongori</i>	V		22
Total			2579

Da diese Nomenklatur nicht im Einklang mit der historischen Systematik der Gattung *Salmonella* steht (Bsp. *choleraesuis*: sowohl Speziesbezeichnung als Synonym für *enterica* als auch Epitheton einer Subspezies und Bezeichnung einer Schweineadaptierten Serovar) und auch nicht die Einteilung nach dem White-Kauffmann-Le Minor-Schema widerspiegelt, besteht mitunter Kontroversität darüber, wie die Serovaren in schriftlichen Dokumenten angegeben werden sollen. Das WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* (WHOCC-Salm) schlägt folgende Schreibweise vor: „*S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, or *S. enterica* serovar Typhimurium, or *Salmonella* ser. Typhimurium“. Serovare anderer Unterarten von *S. enterica* und die von *S. bongori* werden nur mit ihrer Antigenformel angegeben. Diese Nomenklatur liegt ebenfalls der vorliegenden Arbeit zu Grunde, wobei subsp. auch mit ssp. abgekürzt wird.

2.1.2 Morphologie und charakteristische Merkmale der Salmonellen

Bakterien der Gattung *Salmonella* sind gramnegative, ca. 0,5...1,5 µm diametrale x 2...4 µm lange, sporenlose, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien mit geringen Nährstoffansprüchen (60...70 mg Protein l⁻¹). Sie sind in der Regel beweglich und besitzen peritriche Flagellen - mit Ausnahme der Serovar *Salmonella* ser. Gallinarum. (KRÄMER 2002; DEDIÉ, 1993)

Salmonella sind Oxidase negativ, Katalase positiv, reduzieren Nitrat zu Nitrit und fermentieren Glucose zu Ameisensäure, Ethanol, Acetat oder Lactat und Kohlendioxid. Salmonellen sind bis auf einige Vertreter der Subspezies *diarizonae* und *indica* nicht in der Lage, Lactose zu fermentieren. Sie bilden kein Indol, Thiosulfat wird in Schwefelwasserstoff umgewandelt. Ausnahmen bei allen typischen Reaktionen kommen bei der großen Zahl von Serovaren vor. (WEBER, 2010; LE MINOR und POPOFF, 1987; GRIMONT und WEILL, 2007)

Für die Vermehrung der Salmonellen ist eine Temperatur von 37 °C optimal, wobei das Minimum bei 6 °C und das Maximum bei 48 °C liegen. Gegen Hitze sind Salmonellen relativ empfindlich, wobei die Widerstandsfähigkeit gegen trockene Wärme größer als gegen feuchte Wärme ist (D-Wert bei 65 °C stammspezifisch zwischen 0,02...0,25 min). Gegen Kälte sind Salmonellen jedoch resistent, sie überstehen in Lebensmitteln selbst Tiefkühlen. In sauren Medien sterben sie rasch ab (pH_{min} 4,05 (HCL) bzw. 4,4 (Lactat), pH_{max} 9,0). Durch DVG-gelistete Desinfektionsmittel werden sie in wenigen Minuten abgetötet, sofern eine vorhergehende gründliche Reinigung erfolgt. Zum Wachstum sind a_w-Werte von ≥ 0,95 erforderlich, womit alle leicht verderblichen Lebensmittel, wie frisches Fleisch, Eier, Fisch, gegarte Pökelfleischwaren sowie Koch- und Brühwürste zu bevorzugten Substraten gehören. (ROLLE und MAYR, 1993; WEBER, 2010; KRÄMER, 2002)

Die Serovaren lassen sich serologisch anhand ihrer Antigenformel durch den Nachweis somatischer (O-) Antigene, Geißel-(H-) Antigene und Kapsel-(Vi-) Antigene unterscheiden. O-Antigene sind in den komplexen Lipopolysacchariden (LPS) der äußeren Membran lokalisiert, welche aus dem Lipid A, einem Kernpolysaccharid und der O-spezifischen Polysaccharid-Seitenkette (3...8 Einheiten aus Mannose, Rhamnose und Galaktose) als dem eigentlichen O-Antigen bestehen. H-Antigene sitzen in den Flagellen und bestehen aus Protein (Flagellin). Die am Aufbau beteilig-

ten Aminosäuren bestimmen hier die serologische Spezifität. (ROLLE und MAYR, 1993; DEDIÉ et al., 1993; SIFIN, 2006)

Nach MINOR und POPOFF (1987) sind die meisten Salmonellensubspezies bezüglich ihrer H-Antigene diphasisch, wobei die Phasen oft quantitativ unterschiedlich ausgebildet werden.

Das Vi-Antigen ist der eigentlichen Zellwand als Bauelement der Mikrokapsel aufgelagert. Das Kapsel-Antigen ist ein Polysaccharid, welches nur bei *Salmonella* ser. Typhi, *Salmonella* ser. Paratyphi C und sehr selten bei *Salmonella* ser. Dublin vorkommt. Es kann das O-Antigen verdecken und so dessen Nachweis stören. (ROLLE und MAYR, 1993; SIFIN, 2006; BHUNIA, 2008)

2.1.3 Infektionswege

Salmonellen sind für die Vermehrung sowohl im Menschen als auch in Tieren, darunter domestizierte und wild lebende Säugetiere, Reptilien, Vögel und Insekten, hoch adaptiert und können ein breites Spektrum von Krankheiten verursachen (RKI, 2015).

Dabei sind einige *Salmonella*-Serotypen, wie *Salmonella* ser. Typhi, *Salmonella* ser. Paratyphi und *Salmonella* ser. Sendai, nur an den Menschen angepasst und haben keine anderen bekannten natürlichen Wirte. Andere *Salmonella*-Serotypen, wie *Salmonella* ser. Dublin (Rind) und *Salmonella* ser. Choleraesuis (Schwein), haben ein begrenztes Wirtsspektrum, rufen meist an nur eine Tierart angepasste, spezifische Erkrankungen hervor und infizieren nur gelegentlich andere Tiere oder den Menschen. Die überwiegende Zahl der Serovaren, wie die epidemiologisch im Vordergrund stehenden *Salmonella* ser. Typhimurium und *Salmonella* ser. Enteritidis, weisen hingegen keine spezielle Wirtsanpassung auf und können sowohl eine Vielzahl von Tierspezies als auch den Menschen mit geringer bis hoher Virulenz infizieren. (PEGUES und MILLER, 2009; WHO, 2012)

Das natürliche Habitat der Salmonellen ist der Darmtrakt von Mensch und Tier, wobei sich die Subspezies *enterica* und *salamae* gewöhnlich in warmblütigen Tieren finden und die übrigen Unterarten häufig in wechselwarmen und kaltblütigen Tieren sowie der Umwelt vorkommen (GRIMONT und WEILL, 2007).

Ausgehend vom Darmtrakt finden die Erreger durch Ausscheidungen der Haus- und Wildtiere Verbreitung in die Umwelt, wie z.B. Boden, Wasser oder Rohstoffe tierischer und pflanzlicher Herkunft. Dort bleiben sie mitunter lange lebensfähig (siehe Tabelle 2) und führen zur indirekten Reinfektion der ausscheidenden oder Infektion anderer Arten. Eine weitere Möglichkeit ist die Ansteckung durch direkten Kontakt zwischen Menschen und/oder Tieren unter hygienisch unzureichenden Bedingungen. Bei alimentären Infektionen über Lebensmittel und Trinkwasser überwiegt die nachträgliche Kontamination der Nahrung durch inadäquate Küchen- oder mangelnde persönliche Hygiene. Entsprechend der Lebensmittel beim Menschen können Futtermischungen bei Tieren über Rohstoffe tierischer und pflanzlicher Herkunft ebenfalls zur Infektion führen. (DEDIÉ et al., 1993; ROLLE und MAYR, 1993; EFSA, 2012)

Tabelle 2: **Tenazität von Salmonellen in Abhängigkeit der Matrix** (FEHLHABER, 1992; BÖHM, 1993; ROLLE und MAYR, 1993; GAREIS, 1995)

Medium	Nachweisbarkeit
glatte Metalloberfläche	14 Tage
Insekten	16 Tage
Quark	> 2 Wochen
Fleischsalat	> 5 Wochen
Pökelfleisch	mehrere Wochen
Volleipulver	13 Jahre
feuchte Erde	12 Monate
trockene Erde	16 Monate
Schweinekot	27...60 Tage
Gülle	33 Monate
getrockneter Kot	1...4 Jahre

Gemäß des wissenschaftlichen Zoonose-Reports der EFSA (2013) wurde aus den Mitgliedsländern im Jahr 2011 gegenüber den Vorjahren eine leicht sinkende absolute Zahl von 95548 bestätigten Fällen humaner Salmonellosen übermittelt. Die höchsten Level der Nichtkonformität bezüglich des Lebensmittelsicherheitskriteriums gemäß VO (EG) Nr. 2073/2005 (sog. unbefriedigende Ergebnisse) traten 2011 wie in den vergangenen Jahren bei Lebensmitteln tierischer Herkunft auf (6,8 % bei Hackfleisch/Faschiertem und Fleischzubereitungen aus Geflügelfleisch, die zum Verzehr

in durcherhitztem Zustand bestimmt sind; 1,1 % bei Hackfleisch/Faschiertem und Fleischzubereitungen aus anderen Fleischarten als Geflügelfleisch, die zum Verzehr in durcherhitztem Zustand bestimmt sind; 1,4 % bei verzehrsfertigen Produkten, die keiner weiteren Erhitzung unterzogen werden; 1,6 % bei lebenden Muscheln, Stachelhäutern, Manteltieren und Schnecken). Salmonellenbefunde bei Tieren sinken in der EU aufgrund diverser gesetzlicher oder freiwilliger Salmonellenkontrollprogramme stetig und lagen im Jahr 2011 bei 1,9 % in *Gallus gallus* Zuchtherden (davon 0,6 % mit den 5 *Salmonella*-Hauptserovaren Enteritidis, Typhimurium, Infantis, Virchow, Hadar), 3,5 % bei Zuchtputen und 10,1 % bei Mastputen (davon jeweils <1 % *Salmonella* ser. Enteritidis und Typhimurium). Positive Salmonellen-Befunde wurden auch bei anderen Tierarten, darunter Enten, Gänse, Schweine, Rinder, Schafe und Ziegen, gemeldet.

Die Belastung der Futtermittel liegt bei 1,0 % des Fleisch- und Knochenmehls, 9,1 % des Fischmehls, 1,3 % des Getreides und 2,7 % der Ölsaaten und Erzeugnisse daraus, 2,3 % in Rindermischfutter, 1,2 % in Mischfutter für Schweine und 0,2 % in Mischfütter für Geflügel (EFSA (2013)).

2.1.4 Pathogenese

2.1.4.1 *Salmonelleninfektionen beim Menschen*

Bei Erkrankungen des Menschen durch *Salmonella*-Bakterien wird zwischen der Typhus-Paratyphus-Gruppe und den Salmonellosen mit enteritischem Verlauf unterschieden (SELBITZ und BISPING, 1995).

Enteritische Salmonellen verursachen beim Menschen vor allem Gastroenteritiden, auch als Salmonellose bezeichnet (Rki, 2015). Die Inkubationszeit ist kurz, zwischen 6...72 Stunden. Die Infektionsdosis ist mit $10^5 \dots 10^6$ Keimen hoch. Die Salmonellose tritt mit geringem Manifestationsindex auf, die Wahrscheinlichkeit, dass eine mit dem Erreger infizierte Person auch erkennbar erkrankt, liegt bei nur 20 %. Nach Eintritt des Pathogens in den Gastrointestinaltrakt heftet es sich an die Epithelzellen der Mukosa und gibt Endotoxine frei, welche intrazelluläres cyclisches Adenosinmonophosphat aktiviert, das wiederum Elektrolyt- und Wassersekretion aus dem Zellplasma in das Lumen bewirkt. Das bakterielle Einwandern in die Darmschleimhaut und Entzündung dieser führt zu den typischen Symptomen, plötzlich

einsetzende Diarrhoe, abdominale Schmerzen, manchmal Erbrechen und Fieber. Diese Symptome sind nach BHUNIA (2008) und ARVANITAKIS (2011) in der Regel selbstlimitierend. Bakteriämien sind assoziiert mit stark invasiven Erregern wie *Salmonella* ser. Choleraesuis oder *Salmonella* ser. Dublin und können zu Komplikationen wie Meningitis, Osteomyelitis, septische Arthritis, Pneumonie, Endokarditis oder Perikarditis führen. Die Ausscheidung der Erreger wird im Durchschnitt über einen Monat nachgewiesen, kann v.a. bei Kindern jedoch auch länger andauern. Salmonellosen sind vereinzelt mit anhaltender Erregerausscheidung verbunden. (DEDIÉ et al., 1993; RKI, 2015; ARVANITAKIS, 2010)

Generell gelten alle *Salmonella*-Serovaren als humanpathogen, wobei nur ca. 500 Serovaren nachweislich zu Erkrankungen beim Menschen geführt haben. Im Rahmen der Meldepflicht gemäß Infektionsschutzgesetz wurden in Deutschland seit 2001 nur 24 Serovaren mit durchschnittlich mehr als 50 Salmonellose-Erkrankungen im Jahr übermittelt (RKI, 2015). Darunter sind die beiden häufigsten Salmonellen-Serovaren *Salmonella* ser. Enteritidis und *Salmonella* ser. Typhimurium, mit einem Anteil von respektive 44,4 % und 24,9 % im Jahr 2011 an allen der EU übermittelten Salmonellosen beim Menschen, wobei die erstgenannte Serovar v.a. mit dem Verzehr kontaminierter Eier und kontaminierten Geflügelfleischs in Verbindung steht, *Salmonella* ser. Typhimurium mit dem Verzehr von Schweine-, Geflügel- und Rindfleisch (EFSA, 2013).

Typhoidale Salmonellen (*Salmonella* ser. Typhi und *Salmonella* ser. Paratyphi A, B oder C) rufen systemische Infektionen mit Darmbeteiligung hervor – Typhus abdominalis und Paratyphus – wobei *Salmonella* ser. Paratyphi B auch enteritisch verlaufen kann. Reservoir ist ausschließlich der Mensch. In Deutschland wird jährlich eine etwa gleich bleibende, geringe Zahl an Typhus und Paratyphus-Erkrankungen an das RKI gemeldet, im Jahr 2014 waren es 58 respektive 26 gemeldete Fälle (<http://www3.rki.de/SurvStat>, abgerufen am 27.08.2015).

Die Übertragung erfolgt vorwiegend durch Aufnahme von Wasser und Lebensmitteln, die durch Ausscheidungen kontaminiert wurden, wobei latent Erkrankte und Dauerausscheider eine besondere Rolle spielen. Die minimale Infektionsdosis ist kleiner als bei den Enteritis-Salmonellen (10^3 Keime), die Inkubationszeit beträgt etwa ein bis drei Wochen. (RKI, 2015; KRÄMER, 2002; ROLLE und MAYR, 1993)

Typisch für die akute Krankheitsphase sind starke Kopfschmerzen, Bauchschmerzen, Obstipation und eine ausgeprägte Bewusstseinsstrübung (griech. *typhos* = Rauch, Nebel). Mit Durchdringung der Darmschleimhaut ins Lymphsystem und den Eintritt der Erreger in die Blutbahn steigt das Fieber bis 40 °C an. Das zweite Stadium, die Fieber-Kontinua, wird begleitet von den typhus-spezifischen Roseolen, woran sich ein septisches Krankheitsbild mit Diarrhö anschließt. Die Erreger können verschiedene Organe, wie Milz, Leber, Nieren oder die Gallenblase, befallen. Im letzten Stadium, auch Entfieberung genannt, bilden sich die Symptome zurück. Unbehandelt können eine Reihe von Komplikationen auftreten, z.B. Pneumonie, Abszesse, Arthritis. Die Besiedelung der Leber, Gallenwege und Gallenblase kann sich chronifizieren und hat zur Folge, dass die dort angesiedelten Salmonellen kontinuierlich mit dem Stuhl ausgeschieden werden. (RKI, 2008; KRÄMER, 2002)

2.1.4.2 *Salmonelleninfektionen beim Nutztier*

Bei Tieren sind subklinische Infektionen häufig. Der Erreger kann sich durch tote und lebende Vektoren (z.B. infiziertes Futter, Trinkwasser, Kot, Nager, Vögel) zwischen Tieren einer Herde leicht ausbreiten, wobei Tiere zu intermittierenden oder persistierenden Trägern werden können. (ROLLE und MAYR, 1993)

Neben den häufig vorkommenden latenten Infektionen tritt die Salmonellose auch klinisch in Erscheinung. Durch wirtsadaptierte Serovaren werden nach SELBITZ et al. (1995) i.d.R. systemisch verlaufende Infektionen mit teilweise schweren klinischen Bildern ausgelöst, wozu auch invasive, nicht adaptierte Serovaren in der Lage sind.

Beim Rind verursacht nicht nur die wirtsadaptierte Serovar *Salmonella* ser. Dublin, sondern auch nicht angepasste Serovaren zyklische Allgemeinreaktionen, die sich im Magen-Darm-Trakt manifestieren. *Salmonella* ser. Dublin zeichnet sich jedoch durch die schwersten Allgemeinreaktionen und eine lange Persistenz im Tier aus. (SELBITZ et al., 1995)

Am häufigsten wird aus Rinderproben *Salmonella* ser. Typhimurium isoliert, nach HARTUNG (1994) in Deutschland zu mehr als 85 % aus Kälbern und zu ca. 75 % aus Rindern.

Kälber infizieren sich zwischen der 2. und 6. Lebenswoche und erkranken nach 2...8 Tagen Inkubationszeit mit bösartigem, zu durchschnittlich 30 % tödlichem Verlauf, begleitet von Fieber, Durchfall, ggf. pneumonischen Symptomen und Septikämie oder mit milden Verlauf, gekennzeichnet durch mäßige Störungen des Allgemeinbefindens. Mit zunehmendem Alter der Tiere verlaufen Salmonelleninfektionen mild bis latent. Die schwereren klinischen Symptome der Rinder sind gekennzeichnet durch Fieber, Durchfälle, Aborte sowie Milchrückgang. (ROLLE und MAYR, 1993; SELBITZ, 1995)

Nach HARLIZIUS (2012) sind klinische Salmonellenerkrankungen beim Schwein in Deutschland sehr selten und treten weniger häufig als bei Rindern und Schafen auf (EFSA, 2012). An das Schwein angepasste Serovaren sind *Salmonella* ser. Choleraesuis und *Salmonella* ser. Typhisu. Bei den nicht adaptierten Serovaren stehen *Salmonella* ser. Typhimurium, Derby und je nach geographischem Raum *Salmonella* ser. Agona, Infantis und Panama im Vordergrund (SELBITZ et al., 1995).

Wie bei Rindern sind auch bei Schweinen die Jungtiere, vorrangig Absetzer und Jungschweine bis 60 kg, betroffen. Treten manifeste Salmonellosen auf, so verlaufen sie häufig als septikämische Allgemeininfektion mit erregerspezifischen akuten, subakuten bis chronischen Verläufen, begleitet von Fieber, Durchfall, geschwürigen Darmveränderungen und Pneumonien. (ROLLE und MAYR, 1993)

Geflügel zeigt in der Regel keine Anzeichen einer Infektion (EFSA, 2012). Im Falle von apparenten Infektionen werden diese vor allem durch die für Hühnervögel und anderes Geflügel spezifische Serovar *Salmonella* ser. Gallinarum hervorgerufen. Bei Küken bis zur sechsten Lebenswoche tritt vor allem die Biovar Pullorium in Erscheinung und ruft akute septikämische Infektionen mit Erkrankung des Darmes und anderer innerer Organe hervor und führt so zu hohen Verlusten durch Todesfälle. Die Biovar Gallinarum ist für Jung- und ausgewachsene Hennen virulenter und führt durch Erkrankung des Eierstockes zur Verminderung der Legeleistung und dem Legen infizierter Eier. Die nicht adaptierten Salmonellen, darunter am häufigsten die Serovaren *Salmonella* ser. Enteritidis und Typhimurium, führen zu latenten, seltener zu klinischen Infektionen. (ROLLE und MAYR, 1993; SELBITZ et al., 1995)

Bei den Salmonellosen des Schafes unterscheidet man Infektionen mit der tierartspezifischen Serovar *Salmonella* ser. Abortusovis mit Organmanifestation in den Genitalien und dem Hauptsymptom Abort und den Infektionen mit anderen *Salmonella*-

Serovaren (*Salmonella* ser. Typhimurium, Dublin), die häufig latent verlaufen oder Durchfallerkrankungen hervorrufen. (SELBITZ et al., 1995)

Salmonellosen/ *Salmonella* spp. bei Tieren sind gemäß der „Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten“ anzuzeigen. Ausgenommen davon sind Salmonelleninfektionen, für die eine Mitteilungspflicht nach § 4 der „Hühner-Salmonellen-Verordnung“ besteht, sowie Salmonellosen und ihre Erreger des Rindes, soweit die Anzeigepflicht nach § 1 Nr. 28 der „Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen“, besteht. (http://www.bmel.de/DE/Tier/Tiergesundheit/Tierseuchen/_texte/MeldepflichtigeTierseuchen.html, abgerufen am 17.09.2015)

2.1.4.3 Pathogenitätsfaktoren

Für die Symptomatik der Salmonellose sind unterschiedliche Virulenzmerkmale der Bakterien verantwortlich, die z.B. die Besiedlung des intestinalen Epithels, Blockade der Abwehrmechanismen der Wirtszelle, Motilität, den Austausch von genetischem Material oder das Überleben in In-vitro und In-vivo-Umgebungen erleichtern. Als wichtigste Pathogenitätsfaktoren gelten dabei die Invasivität und intrazellulärer Parasitismus. Als Voraussetzung für eine Infektion (Kolonisation) spielen Adhäsionsmechanismen wie Fimbrien eine Rolle, daneben Endotoxine (z.B. Lipid A des LPS) und Proteintoxine, Eisenbindung durch Bildung von Siderophoren sowie die Bildung von L-Formen. (BHUNIA, 2008; SELBITZ et al., 1995; GALÁN, 2001; SELBITZ und BISPING, 1995; SRIKANTH et al., 2011)

Als entscheidender Pathogenitätsfaktor soll in Zusammenhang mit der Sekretion von SipC hier nur auf die Funktion des Typ III Sekretionssystems und der Pathogenitätsinseln eingegangen werden. Nach BHUNIA (2008) existieren in gramnegativen Bakterien verschiedene Sekretionssysteme (Typ I-V), wobei das Typ III Sekretionssystem (T3SS oder TTSS) von zentraler Bedeutung bei der Interaktion von *Salmonella* mit der Wirtszelle ist. Das T3SS ist eine spezialisierte Organelle, bestehend aus ca. 20 Proteinen (GALÁN und COLLMER, 1999; HARAGA et al., 2008). BHUNIA (2008) beschreibt seine Hauptfunktion in der Vermittlung des Transfers von bakteriellen Virulenzproteinen durch eine dritte Membran (neben der inneren und äußeren Membran gramnegativer Bakterien) - die eukaryotische Membran der Wirtszelle. Einmal in der Wirtszelle, können die Effektoren deren zelluläre Funktionen modellie-

ren, z.B. Beeinflussung des zytoskelettalen Aufbaus und der Membran- und intrazellulären Transportprozesse oder zytokine Genexpression (HARAGA, OHLSON und MILLER, 2008). Ein T3SS besteht aus 4 Hauptkomponenten, die den so genannten Nadelkomplex bilden - zwei Paar in den Membranen befindliche Ringe (innerer und äußerer Ring), eine dazwischen liegende hohlzylindrische Struktur sowie ein extern lokalisiertes, nadelförmig abstehendes Gebilde (Abbildung 1).

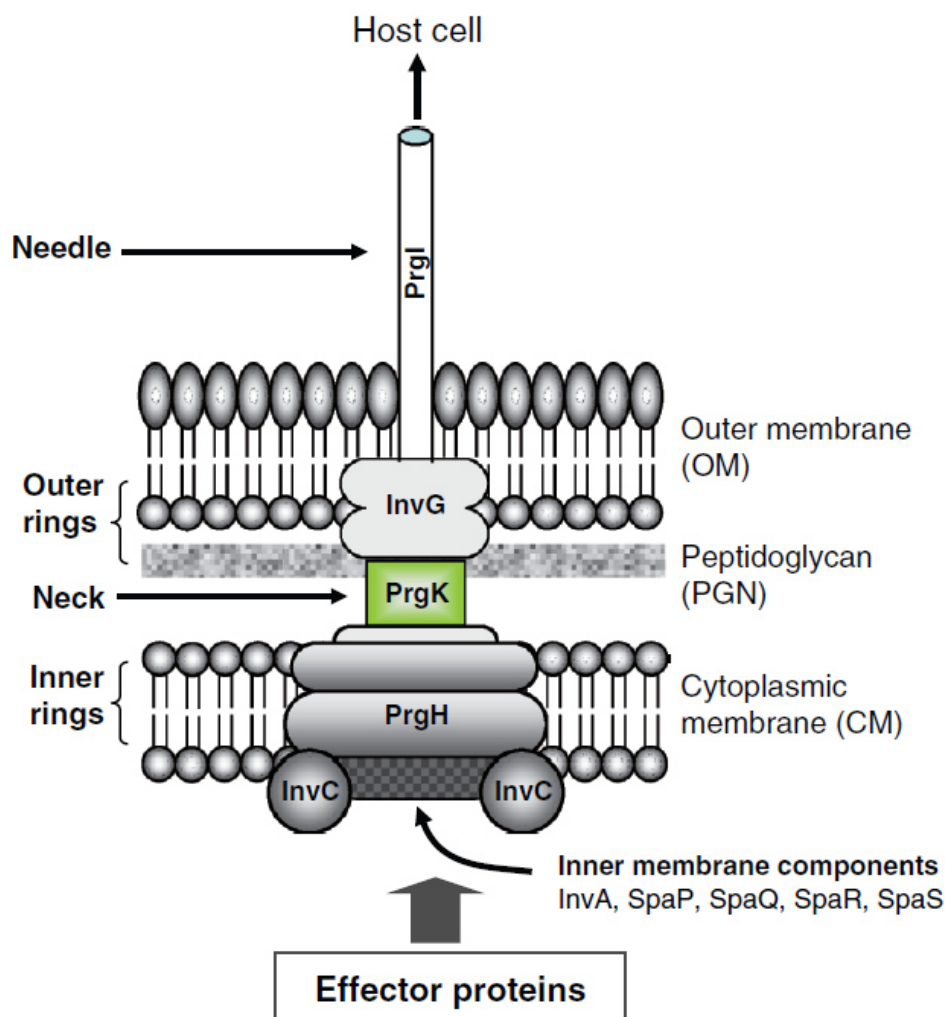


Abbildung 1: **Modell eines Typ III Sekretionssystems von *Salmonella enterica*** (GALÁN und WOLF-WATZ, 2006; GALÁN und COLLMER, 1999)

Das von unterschiedlichen gramnegativen Bakterien genutzte T3SS ähnelt sich im Aufbau, jedoch sind die sezernierten Effektorproteine spezifisch für die jeweilige Spezies. GALÁN (2001) stellte fest, dass *Salmonella* zwei solcher virulenzassoziierten Systeme auf ihren Chromosomen kodiert. Die für die T3SS-Bildung benötigten Gene

befinden sich bei *Salmonella* auf den so genannten Pathogenitätsinseln 1 und 2 (SPI-1, SPI-2). Während das durch SPI-1 codierte T3SS für die anfängliche Wechselwirkung von Salmonellen mit den Darmepithelzellen erforderlich ist, wird der durch SPI-2 kodierte Apparat für das Überleben in Makrophagen und Ausbildung einer systemischen Infektion benötigt. In Übereinstimmung mit ihrer Funktion in verschiedenen Stadien des pathogenen Zyklus, tritt die Expression dieser beiden Systeme auch in verschiedenen Phasen der Infektion auf. Das SPI-1 kodierte System wird von *Salmonella* im Darmlumen ausgebildet, während das SPI-2-codierte System erst aufgebaut wird, nachdem die Bakterien Zugriff auf die Wirtszellen gewonnen haben. Mindestens 19 Polypeptide werden durch das SPI-1 kodierte T3SS sezerniert, darunter auch das SipC-Protein, welches Gegenstand vorliegender Arbeit ist. (GALÁN und COLLMER, 1999 ; GALÁN, 2001; HEESEMAN et al., 2003)

2.1.5 Methoden der Diagnostik

Für den Nachweis von Salmonellen aus unterschiedlichen Matrices (Fleischsaft, Kot, Lebensmittel, Futtermittel, Umweltproben wie z.B. Wasser, Tupferproben aus Ställen und Lebensmittelbetrieben, Kompost) existiert auf europäischer und internationaler Ebene eine Vielzahl von standardisierten Verfahren.

Der Schwerpunkt der Labordiagnostik basiert auch heute noch auf dem horizontalen Verfahren der klassischen Mikrobiologie mit kultureller Voranreicherung zur Reanimierung gestresster oder subletal geschädigter Zellen, sich anschließender selektiver Anreicherung in einem oder mehreren Flüssignährmedien und der Subkultivierung auf ein oder zwei festen Selektivnährmedien (ARVANITAKIS, 2010; D'Aoust, 1981). In der Regel kann eine Verdachtsdiagnose erst ca. zwei bis drei Tage nach Eingang der Probe im diagnostischen Labor gestellt werden. Zur Einordnung der salmonellenverdächtigen Kolonien schließt sich die serologische Differenzierung an, bei der die O- und H-Antigene in Form einer Objektträger-Agglutination untersucht werden. Dazu finden zunächst polyvalente Salmonellen-Testseren Anwendung, um nachfolgend mit monovalenten O- bzw. H-Antiseren die genaue Antigenformel zu ermitteln. Für die gesicherte Aussage, dass eine Salmonellen-Infektion bzw. -kontamination vorliegt, vergehen normalerweise weitere zwei bis drei Tage. Daher werden für den definitiven Nachweis einer Salmonellen-Infektion nicht selten fünf bis

sieben Tage benötigt (ODUMERU und LEÓN-VELARDE, 2012). Insbesondere bei Salmonellosen, die durch kontaminierte Lebensmittel hervorgerufen wurden, stellt der lange Zeitraum bis zur Diagnose ein großes Problem dar, weil sich zwischenzeitlich weitere Personen infizieren können. Zudem ist diese Methodenkaskade sehr materialaufwendig.

Der serologische Antikörperrnachweis gegen Salmonellen spielt vor allem in der Veterinärmedizin und Lebensmittelindustrie in Form von ELISA-Systemen eine große Rolle. So wird z.B. in Deutschland wie auch in angrenzenden Nachbarländern derzeit vor allem der Salmonellen-Antikörperstatus (vorwiegend Anti-LPS-Immunglobulin) von Tierbeständen ermittelt. Der Nachweis erfolgt aus Fleischsaft oder Blut. Nach STRATMANN et al. (2008) handelt es sich hierbei „[...] um ein wenig definiertes Antigen, welches zu Kreuzreaktionen führen kann und vor allem bei der Untersuchung von Proben älterer Tiere vermehrt zu falsch positiven Ergebnissen führt“.

In der Humanmedizin wird dagegen insbesondere bei typhösen Salmonellen-Infektionen der sog. Widal-Agglutinationstest als Ergänzung zum bakteriologischen Erregernachweis eingesetzt. Dabei wird Patientenserum mit abgekochten (O-Antigen-Agglutination) oder formalinisierten (H-Antigen-Agglutination) Salmonellensuspensionen versetzt und auf eine Agglutination der Bakterien untersucht (ARVANITAKIS, 2010). Da nicht alle Infektionen mit der Ausbildung eines Anti-O-Antigen-Titers einhergehen, Antikörper gegen H-Antigene über Jahre nach der Infektion persistieren können und Titer gegen O-Antigene meist nach wenigen Wochen wieder abfallen, kann mit einem derartigen Verfahren nicht zuverlässig zwischen einer akuten oder bereits überwundenen Infektion unterschieden werden (SCHUTZRECHT EP 1 913 394 B1).

Aufgrund der Brisanz einer Salmonelleninfektion bei Mensch und Tier existieren gegenüber der klassischen mikrobiologischen Methode mittlerweile eine Vielzahl schnellerer und alternativer Nachweisverfahren, wie z.B. modifizierte halbfeste Medien (*Salmonella* Rapid Test der Fa. Oxoid, MSRV-Medium der Fa. Heipha, Merck, Diasalm-Medium der Fa. Merck), Impedanz-Verfahren, molekularbiologische Verfahren mittels Gensonden (Gene-Trak *Salmonella* der Fa. Neogen) bzw. mittels Polymerasekettenreaktion (TaqMan *Salmonella* PCR Amplification/Detection Kit der Fa. PE Applied Biosystems, Bax Pathogen Detection System-Screening *Salmonella* der Fa. DuPont Qualicon, etc.) sowie diverse immunologische Verfahren, die auf ei-

ner Agglutinationsreaktion (Spectate *Salmonella* Test der Fa. R-Biopharm Rhone, etc.) beruhen bzw. Enzyme Linked Immunosorbent Assays (Singlepath *Salmonella* der Fa. Merck, TECRA *Salmonella* Ultima der Fa. TECRA International, etc.).

Obwohl zur Aufklärung von Krankheitsausbrüchen und zum Nachweis von Salmonellenkontaminationen bereits eine Vielzahl von Methoden existiert, besteht vor allem aus Verbraucherschutzgründen immer ein Bedarf an noch schnelleren und sicheren Verfahren bei kostengünstiger und einfacher Anwendung. Eine Auswahl der derzeit am internationalen Markt befindlichen, führenden Nachweisverfahren für *Salmonella* spp. kann unter Angabe der technischen Daten im Vergleich mit den eigenen Entwicklungszielen dem Anhang 1 entnommen werden.

2.2 SipC

2.2.1 Aufbau und Bildung bei Kontakt mit der Wirtszelle

SipC ist ein Polypeptid, welches im Zusammenhang mit dem T3SS (siehe Kapitel 2.1.4.3) sowohl als membranverankertes Translokations- als auch als in die Wirtszelle transloziertes Effektorprotein agiert (SRIKANTH et al., 2011; SCHERER et al., 2000; ZIGANGIROVA et al., 2012). Seine Atommasse beträgt 42983 Da, seine Länge 409 Aminosäuren. Die Nukleotidsequenz des SipC-Gens ist bekannt und steht über Gen-Datenbanken zur Verfügung (Abbildung 2).

Die Aminosäuresequenzen des Proteins verschiedener Salmonellen-Serovaren weisen nur geringe Unterschiede auf. Der genetische Unterschied zu Proteinen anderer Spezies mit ähnlicher Funktion (z.B. Effektorprotein IpaC der *Shigella* spp.) ist dabei recht hoch. (SUÁREZ und RÜSSMANN, 1998; GALÁN, 1996).

Zudem bilden Salmonellen bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt die Proteine des Typ III-Sekretionssystems. SCHERER et al. (2000) konnten das Eindringen von SipC in die Plasmamembran der Zielzellen im Zusammenhang mit der Funktion als Translokationsprotein bereits 15 min nach der Infektion mit *Salmonella* ser. Typhimurium nachweisen. In einem anderen Versuch zeigten COLLAZO und GALÁN (1997) im Labormaßstab, dass sich *Salmonella* ser. Typhimurium bereits 2 h nach der Infektion an kultivierte intestinale Zellen angeheftet hatte und SipC transloziert wurde. Es wurde gleichmäßig im Zytosol verteilt. Weiterhin stellten die Autoren fest, dass der Sek-

retionsprozess nicht zwangsweise an die Translokation gekoppelt ist, sondern SipC auch ins umgebende Medium abgegeben wurde. Nur 10 % des SipC wurde in die Wirtszelle transportiert, der überwiegende Anteil wurde in sich nicht angehefteten Bakterien (35 %) und im Infektionsmedium (37 %) gefunden. Diese Erkenntnis konnte von DAEFLER (1999) in seinen Experimenten zur Untersuchung der Sekretion von *Salmonella* ser. Typhimurium in Zellkulturüberständen bestätigt werden.

10	20	30	40	50	60
MLISNVGINP	AAYLNNHSVE	NSSQTASQSV	SAKDILNSIG	ISSSKVSDLG	LSPTLSAPAP
70	80	90	100	110	120
GVLTQTPGTI	TSFLKASIQN	TDMNQDLNAL	ANNVTTKANE	VVQTQLREQQ	AEVGKFFDIS
130	140	150	160	170	180
GMSSSAVALL	AAANTLMLTL	NQADSKLSGK	LSLVSFDAAK	TTASSMMREG	MNALSGSISQ
190	200	210	220	230	240
SALQLGITGV	GAKLEYKGLQ	NERGALKHNA	AKIDKLTTES	HSIKNVLNGQ	NSVKLGAEGV
250	260	270	280	290	300
DSLKSLNMKK	TGTDATKNLN	DATLKSNAQT	SATESLGIKD	SNKQISPEHQ	AILSKRLESV
310	320	330	340	350	360
ESDIRLEQNT	MDMTRIDARK	MQMTGDLIMK	NSVTVGGIAG	ASGQYAATQE	RSEQQISQVN
370	380	390	400		
NRVASTASDE	ARESSRKSTS	LIQEMLKTME	SINQSKASAL	AAIAGNIRA	

Abbildung 2: **Aminosäurefrequenz des SipC-Proteins von *Salmonella* ser. Typhimurium (strain LT2 / SGSC1412 / ATCC 700720)**, basierend auf UniProt, abgerufen am 05.02.2013

Die Beobachtung zur anscheinend unabhängig voneinander auftretenden Sekretion und Translokation führte zu der Annahme, dass die Effektorproteine einschließlich SipC mit der Wirtszelle sowohl extrazellulär als auch intrazellulär agieren (SRIKANTH et al., 2011; DAEFLER, 1999).

2.2.2 Aufgaben bei der Zellinvasion

SipC nimmt bei der Invasion der Wirtszelle eine Doppelrolle ein, es agiert als Effektorprotein in der Wirtszelle und stellt auch eine Komponente des Sekretionsapparates dar (siehe Abbildung 3). In letztgenannter Funktion ist SipC erforderlich für die Überführung aller SPI-1 T3SS-Effektor-Moleküle in die Wirtszellen, indem es am Translokationsapparat (auch Translocon) mitwirkt. Translokatoren wie SipC werden dazu zuerst sekretiert und produzieren eine Pore oder einen Tunnel in der Wirtszellmembran, durch die dann wiederum Effektorproteine eintreten können. (HARAGA et al., 2008; ZIGANGIROVA et al., 2012; SCHERER et al. 2000).

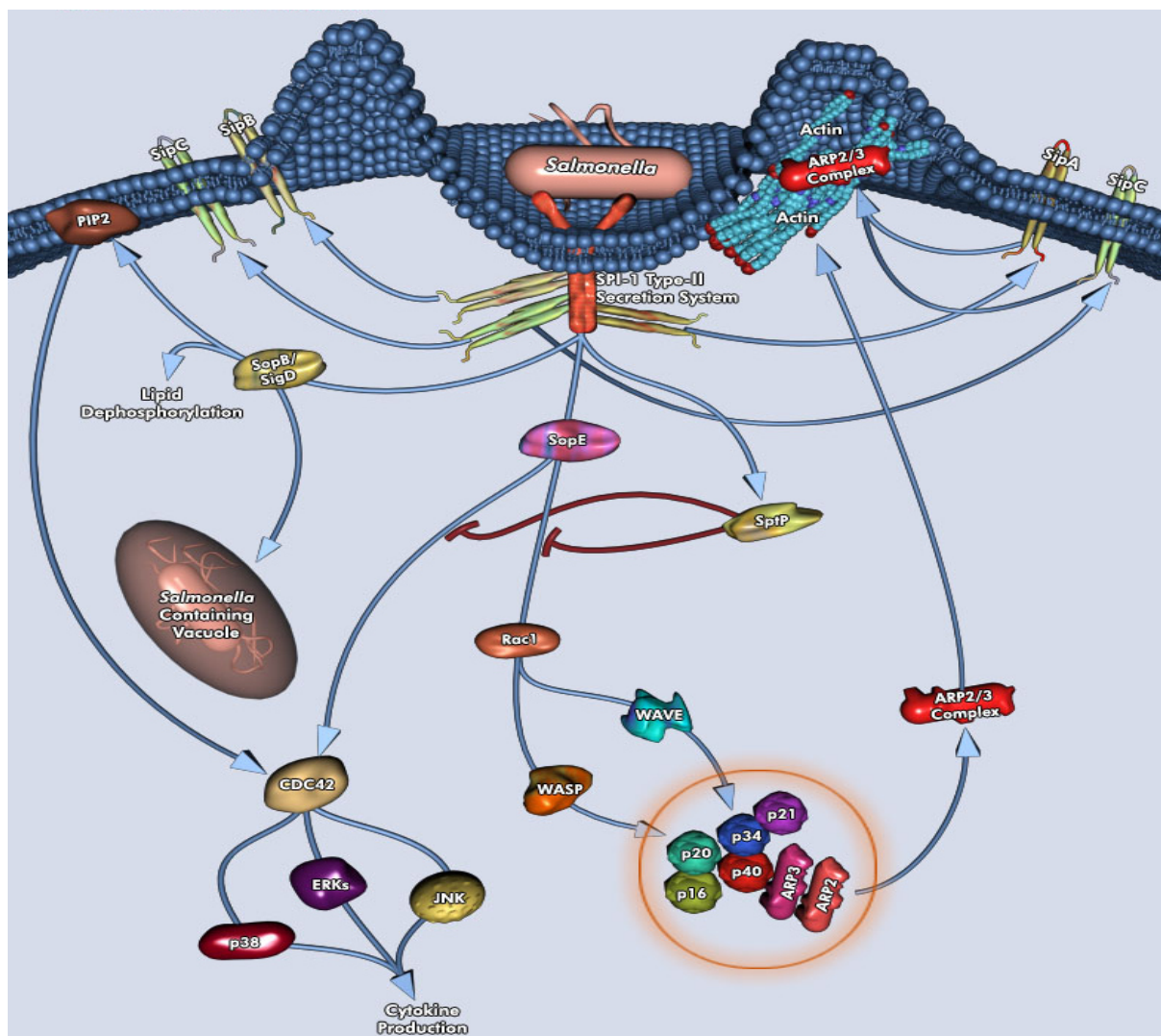


Abbildung 3: **Salmonellen-Infektion.** Effektorproteine Sip, Sop, Sig, SptP und ihre Interaktionen mit der Wirtszelle: Stimulation der GTPasen Rac1 und CDC42, Aktivierung der nachgeschalteten MAP-Kinasen JNK, ERK und p38 sowie der Proteine WASP, WAVE und Beeinflussung der Aktinpolymerisation mittels ARP2/3-Komplex aus ARP2 und 3 sowie p40, p34, p21, p20 und p16 (Quiagen®, <https://www.qiagen.com/de/products/genes%20and%20pathways/pathway%20details.aspx?pwid=401>, abgerufen am 07.02.2013)

Davon unabhängig ist SipC in der Lage, in das Zytoplasma einzudringen und dort als Effektorprotein zu wirken, indem es den Wirt dazu veranlasst, das Bakterium einzuhüllen. SipC modelliert den zytoskelettalen Aufbau am Kontaktpunkt mit der Wirtszelle, womit das Eindringen und die intrazelluläre bakterielle Fortbewegung erleichtert werden. Dies geschieht durch Aktinpolymerisation und -kondensation der Aktinfilamente (auch „bundling“ genannt) zu einem intrazellulären Netzwerk direkt unterhalb der eindringenden Salmonelle (siehe Abbildung 4). Angriffspunkt ist dabei hauptsächlich das F-Aktin. Es werden aber auch die Cytokeratin-Proteine CK8 und CK18 als Ziel beschrieben. (COLLAZO und GALÁN, 1997; GALÁN, 2007; HAGARA et al., 2008; HUECK, 1998; HAYWARD und VASSILIS, 1999; MCGHIE et al., 2001).

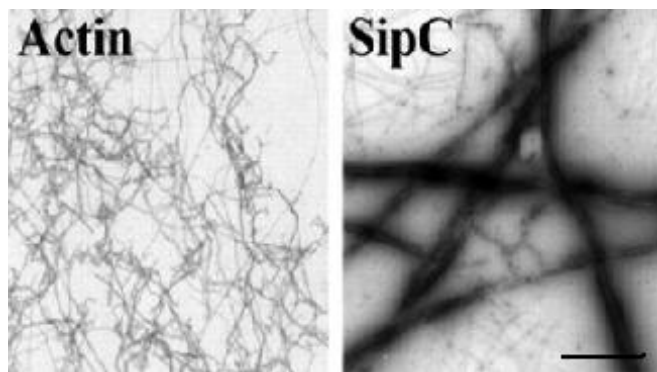


Abbildung 4: Transmissions-Elektronen-Mikrograph von natürlichem F-Aktin (links) und gebündelter Filamente durch Zugabe von Sip-C (rechts) (MYENI und ZHOU, 2010)

Das Strukturprotein Aktin kommt in allen eukaryotischen Zellen vor und ist Bestandteil des Zytoskeletts. Für die Stabilisierung der Zellform, intrazelluläre Transporte und die Zellmotilität dient seine dynamische, multimere, filamentöse Form (F-Aktin), die aus seiner monomeren Form (G-Aktin) durch Steuerung von Aktinbindenden Proteinen generiert

wird (CHEN et al., 2000). Neben den Aktinfilamenten wird das Zytoskelett eukaryotischer Zellen auch durch Intermediärfilamente und Mikrotubuli gebildet. Zu den Intermediärfilamenten gehören verschiedene Cytokeratine, darunter die in Epithelzellen vorkommenden Proteine CK8 und CK18, die nach einem Versuch von CARLSON (2002) ebenfalls an der Interaktion mit SipC in der Wirtszelle beteiligt sind.

2.3 Lateral Flow Assay

Für den Nachweis einer Salmonelleninfektion/-kontamination soll im Rahmen dieser Arbeit ein Lateral Flow Assay (LFA), auch Lateral Flow Device oder Querfließschnelltest, genutzt werden. Dieses Testformat wurde ausgewählt, da für den Nachweis keine spezielle und kostspielige Laborausstattung notwendig ist. Zudem sind LFAs einfach zu bedienen, lagerstabil und können kostengünstig hergestellt werden. Die begrenzte Fähigkeit von LFAs, quantitative Ergebnisse zu liefern, ist im Hinblick auf die Salmonellenschnelldiagnostik von untergeordneter Bedeutung, da alle Salmonellenserovaren als potentiell pathogen angesehen werden, womit eine quantitative Aussage nicht notwendig, sondern eine „Ja/Nein“-Antwort ausreichend ist.

Der Querfließschnelltest wird für verschiedenste Diagnosezwecke eingesetzt. Eine weit verbreitete und allseits bekannte Anwendung des LFA ist der häusliche Urin- oder Stäbchenschnelltest zum Schwangerschaftsnachweis. Daneben dient er z.B. dem Nachweis des Versagens innerer Organe (z.B. Herzinfarkt, Niereninsuffizienz), einer Infektion oder Kontamination mit spezifischen Krankheitserregern, des Vorhandenseins von toxischen Verbindungen in Lebensmitteln, Futtermitteln oder der Umwelt und des Missbrauchs von Drogen.

2.3.1 Einordnung der Lateral Flow Assays innerhalb der Immunoassays

Der LFA ist ein vorgefertigter Streifen eines Trägermaterials aus Trockenkomponenten, welcher durch das Auftragen des flüssigen Probenmaterials aktiviert wird. Er gehört zu den immunologischen Analysemethoden und basiert daher auf dem gleichen Prinzip wie andere immunologische Assays, z.B. Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) oder Radioimmunoassay (RIA). Zum Nachweis des Analyten aus einer Flüssigkeit wird die sehr spezifische Erkennung des Antigens durch Antikörper genutzt. Die zum Einsatz kommenden Antikörper können sowohl polyklonale als auch monoklonale sein. (RAEM und RAUCH, 2007; POSTHUMA-TRUMPIE et al., 2009)

Zusätzlich haben sie chromatographische Eigenschaften, weshalb die LFAs auch als Immuno-Chromatographie bezeichnet werden. Die Anwesenheit des Analyten wird ab einer bestimmten Schwellenkonzentration mit einem Farbsignal nachgewiesen. Dazu dient der Einsatz markierter Reagenzien, z.B. mit Enzymen (ELISA) oder, wie

in dieser Arbeit, mit Goldkolloiden. Bei ausreichender Menge an nachzuweisendem Analyt ist eine Erkennung mit bloßem Auge möglich.

Nach KLEWITZ (2005) können immunologische Tests nach unterschiedlichen Gesichtspunkten eingeteilt werden, z.B. nach der Probenart (antigenhaltig oder antikörperhaltig), der Analysenart (qualitativ oder quantitativ) oder der Form des Gesamtsystems, welche in folgender Abbildung 5 dargestellt ist.

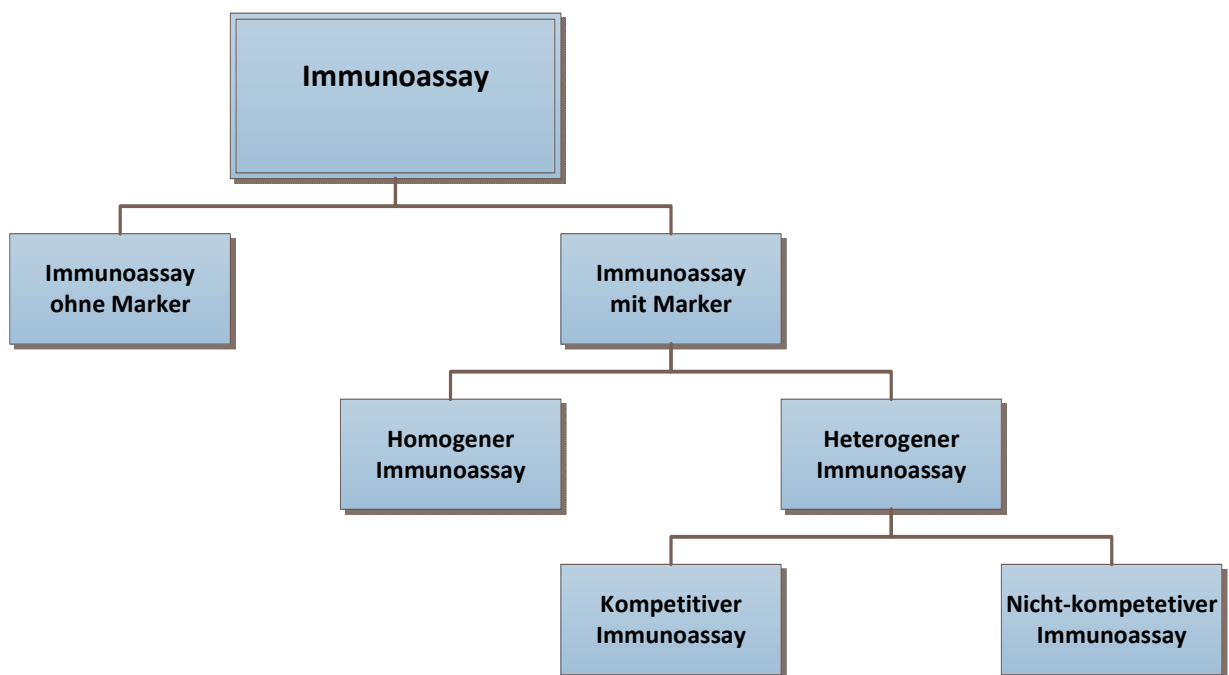


Abbildung 5: **Einteilung von Immunoassays nach der Form des Gesamtsystems**
(KLEWITZ, 2005; HERING und SCHÖNFELDER, 2012)

Nach dieser Einteilung gehören LFA zu den markierten, heterogenen Immunoassays, da sie auf der Verwendung von gelabelten und von an einer festen Phase immobilisierten Nachweisreagenzien basieren, während sich die anderen Reaktanden in einer Flüssigphase befinden. Anhand der mobilen Phase werden weiter sowohl nicht kompetitive (alleinige Migration der Probe) als auch kompetitive (zusätzliche Zugabe einer zweiten Reagenzlösung mit dem markierten nachzuweisenden Antigen in bekannter Konzentration) LFAs unterschieden (WARSINKE, 2009). Da in vorliegender Arbeit nur der nicht kompetitive Typ, auch Sandwich genannt, zum Einsatz kommt, wird dieser im Weiteren vorgestellt und im experimentellen Teil genauer untersucht.

2.3.2 Aufbau eines nicht kompetitiven LFA

In LFAs fließt die zu analysierende Probenflüssigkeit passiv mittels Kapillarkraft durch den Teststreifen. Die Flüssigkeitsbewegung wird dabei durch die Benetzbarkeit und die Struktur des porösen Streifenmaterials gesteuert, welches aus vier sich leicht überlappenden Zonen mit unterschiedlicher Funktion besteht: einer Probenunterlage (Sample Pad), einer Konjugatunterlage (Conjugate Pad), einer Detektionsmembran mit eng aneinanderliegenden Banden als Test- und Kontrolllinie und einem Filterpapier (Absorbent-Pad). Der empfindliche Teststreifen wird von einem stabilen Kunststoffgehäuse (Housing) eingefasst (siehe Abbildung 6). Dieses weist eine Probeneinlassöffnung (Sample inlet) und ein Sichtfenster (Detection window) auf.

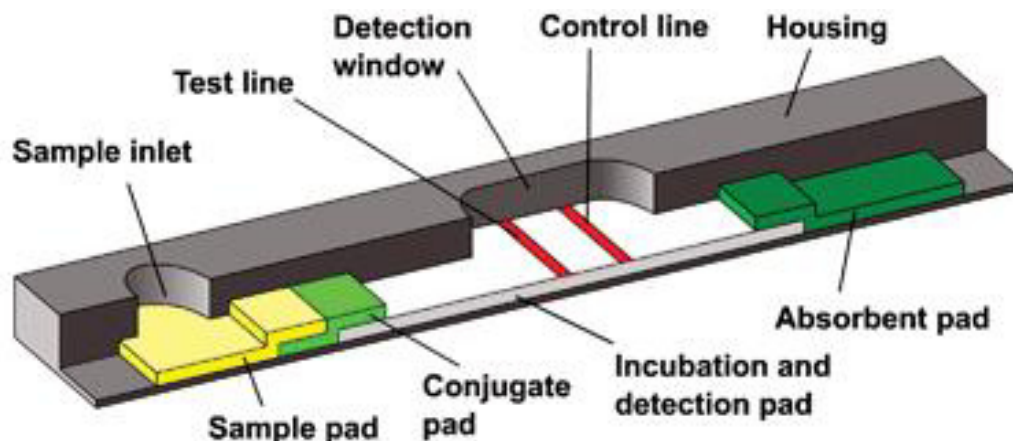


Abbildung 6: **Schematischer Aufbau eines Lateral-Flow-Tests** (MARK et al., 2010)

Der innen liegende Teststreifen besteht aus unterschiedlichen, saugfähigen Materialien mit ausreichend kapillarer Kapazität, um die Probenflüssigkeit durch den gesamten Test zu transportieren. Die Probe wird über die Probeneinlassöffnung des Kunststoffgehäuses auf das Sample Pad aufgebracht, von wo aus sie durch Kapillarkraft in das Konjugat-Pad (Conjugate pad) fließt. In diesem ist das Detektionsreagenz, üblicherweise ein Antikörper (z.B. an Latex- oder Goldpartikel gebunden) eingelagert, aber nicht fest gebunden. Das Konjugat wird durch die Probenflüssigkeit gelöst und beginnt mit der Probe entlang der Laufrichtung durch die Membran (Incubation and detection pad) zu fließen, während der in der Probe befindliche Analyt an den Detektor bindet. Passiert die Probe die Höhe der Testlinie (Test line), auf der ein Fängerantikörper immobilisiert ist, wird der Analyt-Detektor-Komplex am

freien Epitop gebunden, festgehalten und konzentriert, wobei ein deutliches Signal in Form einer abgegrenzten farbigen Linie produziert wird. Die Farbentwicklung ist proportional zur Menge des Analyten in der Probenflüssigkeit. Eine zweite Linie, die Kontrolllinie (Control line), ist mit einem Anti-Spezies-Antikörper immobilisiert und fängt die überschüssigen markierten Komplexe, die nicht an die Antikörper der Testlinie gebunden haben. Die Kontrolllinie zeigt somit den erfolgreichen Testverlauf an, während die Testlinie das Vorhandensein oder das Fehlen des spezifischen Analyten markiert. Obwohl eine Quantifizierung durch spezielle Reader technisch möglich ist, werden kommerziell erhältliche Streifentests üblicherweise mit bloßem Auge ausgewertet und lassen daher nur qualitative bzw. semiquantitative Aussagen zu (siehe Abbildung 7). Um die Flüssigkeitsbewegung durch die Membran zu unterstützen und einen Rückfluss zu verhindern, befindet sich am Ende des Teststreifens ein Absorbent Pad, welches überschüssige Flüssigkeitsmengen aufnimmt. (SCHUBERT-ULRICH et al., 2009; MARK et al., 2010; ZHANG et al., 2009)



Abbildung 7: **Darstellung eines LFA in einem Kunststoffgehäuse am Beispiel des Singlepath® Salmonella Tests der Firma Merk KGaG**, Ausbildung der Testlinie in Abhängigkeit der Konzentration des Analyten (von links nach rechts: unverdünnt, 10-fach, 100-fach)

2.3.3 Funktionen der Einzelkomponenten

Die verschiedenen Pads des Teststreifens repräsentieren unterschiedliche Funktionen. Ausführliche Beschreibungen der Einzelkomponenten eines LFA finden sich in diversen Herstellerinformationen, z.B. von Millipore Corp., Schleicher & Schuell, Whatman Inc., Pall Bioscience etc. Zur Übersicht soll an dieser Stelle nur auf die Funktion der Komponenten unter besonderer Berücksichtigung der im experimentellen Teil genutzten Materialien eingegangen werden.

2.3.3.1 *Sample Pad*

Die Hauptfunktion des Sample Pads ist die Zufuhr und Verteilung der Probenflüssigkeit zum Conjugate Pad. Das Material muss daher porös sein und über eine hohe Saugkraft verfügen und dennoch eine hohe Stabilität bei Nässe aufweisen. Übliche Materialien sind Zellulose, Viskose und Glasfaser. Letztere Variante wird eingesetzt, um grobe Partikel aus der Probenflüssigkeit zurückzuhalten, z.B. ganze Zellen aus einer Blutprobe, oder aber, wie in vorliegender Arbeit, bei kombinierter Verwendung des Materials als Sample und Conjugate Pad.

2.3.3.2 *Conjugate Pad*

Dies ist üblicherweise der kleinste Bestandteil eines LFA, erfüllt aber vielfältige Aufgaben. Die Unterlage muss das aufgegebene Konjugatvolumen absorbieren, wobei es dieses nicht fest binden darf, es muss die Haltbarkeit im trockenen Lagerstadium gewährleisten, muss das Konjugat bei Kontakt mit der Probenflüssigkeit vollständig und einfach wieder abgeben und dabei dessen Interaktion mit dem Zielanalyten ermöglichen. Diese Eigenschaften besitzen vor allem Materialien aus Glasfaser, aber auch Zellulose-Vliese werden eingesetzt. (POSTHUMA-TRUMPIE et al., 2009)

Es gibt zwei Möglichkeiten, das Konjugat auf die Unterlage zu übertragen: Eintauchen des Kissens in die Konjugatlösung oder das Dispergieren eines definierten Volumens pro Fläche des Pads. Da das Padmaterial natürlicherweise Schwankungen in seiner Dicke aufweist, führt die erste Methode dazu, dass nach Vollsaugen unterschiedliche Mengen an Konjugat für den Teststreifen zur Verfügung stehen, was mit einer schlechten Reproduzierbarkeit einhergeht. Der Nachteil des Dispergierens ist

hingegen, dass spezielles Equipment zum Auftragen der Konjugatlösung erforderlich ist, ein sogenannter Dispenser (HOCHLEITNER, 2012). Zur Vereinfachung der Handhabung wurde in dieser Arbeit auf einen Dispenser verzichtet. Die Proben wurden vor Auftrag mit einer definierten Menge Konjugat versetzt und, wie unter Kapitel 2.3.3.1 beschrieben, auf ein doppelt gelegtes bzw. leicht überlappendes Sample Pad aus Glasfaser aufgegeben.

2.3.3.3 *Membran*

Das am häufigsten eingesetzte Trägermaterial für einen LFA ist eine Nitrocellulosemembran, welche auch für die eigenen Versuche verwendet wurde. Weitere mögliche Polymere wären z.B. Nylon, Polyethersulfon oder Polyethylen, die am Markt jedoch weniger erfolgreich vertreten sind, da die Kosten höher sind, die Verfügbarkeit begrenzt ist, abweichende Prozessanforderungen bestehen und letzten Endes deutlich weniger Erfahrungen mit diesen Materialien vorliegen. Zum besseren Handling kann die Unterseite der empfindlichen Membran, wie im eigenen Versuch, mit flexiblem Kunststoff laminiert sein. (AVONDET et al.; O'FARRELL, 2009)

Nitrocellulose ist mit den unterschiedlichsten Porengrößen erhältlich, wobei aufgrund des Herstellungsprozesses eher von einer netzartigen Struktur statt von Poren gesprochen werden muss. Die Materialien werden auf Basis der Fließgeschwindigkeiten klassifiziert, weil die Porengröße im Verhältnis zur Fläche nicht messbar ist (MANSFIELD, 2009). Die höchste Sensitivität erreicht man mit kleinen Porengrößen (mehr Nitrocellulosefasern pro Fläche) und demzufolge langsamen Transport des Analyten durch die Membran und besseren Bindungseigenschaften der Antikörper. Bei ausreichend zur Verfügung stehendem Analyt und hoher Affinität der Antikörper-Antigen-Reaktion werden gröbere Netzwerke genutzt, die zu einer schnelleren Fließgeschwindigkeit führen. Da Nitrocellulose ursprünglich hydrophob ist, werden die Membranen häufig mit anionischen Tensiden benetzt (HOCHLEITNER, 2012).

Entscheidend bei der Wahl des Materials ist jedoch nicht allein dessen hydrophile und gleichbleibende Fließeigenschaft, sondern ebenfalls die Fähigkeit, Proteine nur an den gewünschten Stellen - im Bereich der Test- und Kontrolllinie - zu immobilisieren. Nach O'FARRELL (2009) kommt diese Bindung aufgrund elektrostatischer Anzie-

hung zu Stande, langfristig über hydrophobe Wechselwirkung und Wasserstoffbrückenbindungen.

Gegebenenfalls werden freie Bindungsstellen der Membran nach Auftrag der Test- und Kontrolllinie durch sogenanntes Blocken abgesättigt. Dies kann neben dem Schutz vor unspezifischen Bindungen an anderen Stellen der Membranoberfläche auch die Fließrate und den Feuchtigkeitshaushalt der Membran über die gesamte Länge der Haltbarkeit stabilisieren. In den eigenen Versuchen wurde auf diesen Schritt verzichtet, da zum Einen laut Herstellerangabe stabile Fließraten auch ohne Blocken erreicht werden, zum Anderen die Analytik ohne Lagerung der Teststreifen unmittelbar nach Herstellung der LFAs erfolgte. Des Weiteren stand keine spezielle Laborausrüstung zum Spülen und Trocknen unter standardisierten Bedingungen zur Verfügung, so dass die Gefahr von Variationen im Endprodukt bestand.

2.3.3.4 *Absorbent Pad*

Die Aufgabe des Absorbent Pad ist es, den Fluss durch die Membran zu unterstützen, indem überschüssiges Probenmaterial und alle nicht absorbierten Reagenzien aufgesaugt werden. Es muss so lange wie möglich vor dem Rückfluss in die Membran schützen. Daher wird üblicherweise ein Baumwollpapier mit einer deutlich höheren Aufnahmekapazität als das Probenvolumen gewählt. Nach POSTHUMA-TRUMPIE et al. (2009) müsste das aufgegebene Probenvolumen ohne Absorbent Pad deutlich minimiert werden, was zu einer sinkenden Sensitivität führen würde.

2.3.3.5 *Marker*

Die am häufigsten genutzten Markierungen in LFA sind kolloidales Gold (CHANDLER et al. 2000) und Latexpartikel, wobei für die eigenen Untersuchungen Goldpartikel eingesetzt wurden. In visuell ausgelesenen LFAs ist es durch die geringere Größe der Goldpartikel und damit einhergehende, größere erreichbare Packdichte an der Testlinie möglich, eine höhere Sensitivität zu erreichen. Goldpartikel haben Größen von 20...40 µm, Latexpartikel hingegen um die 100...300 µm. Die Farbe der Goldpartikel ist intensiv rot-violett, die Markierung sehr stabil in Flüssigkeiten wie auch in trockener Form und blässt nach der Färbung auf der Membran nicht aus. (CHUN, 2009; O'FARRELL, 2009)

2.3.3.6 *Antikörper*

Zentraler Punkt des gewählten immunologischen Testsystems ist das Vorhandensein von mindestens zwei AK. Da diese jedoch nicht kommerziell erhältlich waren, wurden die ersten Schritte in der Entwicklung des LFA mit selbst produzierten pAK durchgeführt. Diese sind im Vergleich zu mAK schneller, oft unkomplizierter und preisgünstiger herzustellen (LUTTMANN et al., 2014). Nach Feststellung der grundsätzlichen Eignung der Anti-Peptid-AK für die Anwendung wurde die Produktion mAK in Auftrag gegeben, da das Ziel der Arbeit nicht in der eigenen Herstellung der AK lag. So konnte im Laufe der Entwicklung auf spezifische AK in einer ausreichenden Menge und Konzentration sowie gleichbleibender Qualität zurückgegriffen werden.

3 Material und Methoden

3.1 *Material*

3.1.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Gängige Laborausrüstung, wie z.B. Pipetten, Waagen, Brut- und Kühlschränke, sowie Glas- oder Einwegmaterial werden in folgender Auflistung (Tabellen 3 und 4) nicht explizit dargestellt.

Tabelle 3: **Verwendete Geräte**

Gerät	Hersteller
Autoklav	H + P Labortechnik
Bio-Dot [®] Microfiltration Apparatus	Bio-Rad
Elektrophoresekammer	Sci-Pas
ELISA-Reader	BioTek
Laminar Flow Sicherheitswerkbank 2	BDK
Photometer	Helius
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific
Semi-Dry Electroblotting	Sci-Pas
UV Monitor	Bio-Rad
UC Recorder	Bio-Rad
Vakuumpumpe	Bio-Rad
Vertikalkammer	Hoefer
Vortexer	Bender & Hobein AG
Zentrifuge	Sigma, Heraeus

Tabelle 4: **Verwendete Materialien**

Material	Hersteller
ELISA-Platte, 96 wells	Thermo Fisher Scientific Inc.
Filterpapier, 1 mm (Western Blot)	Carl Roth GmbH
Filterpapier, thick für Bio-Dot [®] (Dot Blot)	Whatmann
Glasfaser GFB-R7, 0,6 µm	MDI
Kunststoffkassette Device-3	MDI
Nitrozellulosemembran CNPF-SN12 L2-H50, 10µm (LFA)	MDI
Nitrozellulosemembran (Dot Blot)	Bio-Rad
Protein-A-Säule HiTrap rProtein A FF 1ml	GE Healthcare
Roti [®] -PVDF Transfermembran	Carl Roth GmbH
Roti [®] -Mark Prestained	Carl Roth GmbH
Sterilfilter, 0,2 µm	Sarstedt
SulfoLink [®] Immobilization Kit for Peptides	Thermo Fisher Scientific Inc.
UV-Küvette	Plastibrandt
Zellulosefilterpapier AP-080, 0,8 mm	MDI

3.1.2 Chemikalien und Fertigmedien

Tabelle 5: **Verwendete Chemikalien und Fertigmedien**

Substanz	Hersteller
Acryl-Bisacrylamid-Lösung (29:1)	Carl Roth GmbH
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma Aldrich
Brillantgrün für die Mikroskopie	Carl Roth GmbH
Casein-Soja-Pepton-Bouillon, dehydriert	Oxoid
Citronensäuremonohydrat	Carl Roth GmbH
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat Na_2HPO_4	Carl Roth GmbH
gepuffertes Peptonwasser, dehydriert	Oxoid
Glycin	Carl Roth GmbH
Kaliumchlorid KCl	Carl Roth GmbH
Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4	Carl Roth GmbH
Konjugat Verdünnungspuffer (KVP)	DRG Instruments
Lactose-Bouillon, dehydriert	Oxoid
L-Cystein-HCL	Thermo Fisher Scientific Inc.
Magermilchpulver	VWR
Methanol	Carl Roth GmbH
Nährbouillon, dehydriert	Oxoid
Natriumacid	Sigma Aldrich
Natriumchlorid NaCl	Carl Roth GmbH
Natriumdodecylsulfat (SDS) $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$	Carl Roth GmbH
Natriumhydrogencarbonat NaHCO_3	Carl Roth GmbH
Poly(oxy-1,2-ethandiyl)- monododekansäure-sorbitylester (Tween 20) $\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$	Sigma Aldrich
Ringer für ¼ starke Lsg., Tablette	Oxoid

Substanz	Hersteller
Roti [®] -Blot A, pH 7,8	Carl Roth GmbH
Roti [®] -Blot K, pH 8,5	Carl Roth GmbH
Roti [®] -Load 1	Carl Roth GmbH
Roti [®] -Mark Prestained	Carl Roth GmbH
SulfoLink [®] TCEP-Lösung	Thermo Fisher Scientific Inc.
SulfoLink [®] Kopplungspuffer, pH 8,5	Thermo Fisher Scientific Inc.
SulfoLink [®] L-Cystein x HCL	Thermo Fisher Scientific Inc.
SulfoLink [®] Waschlösung	Thermo Fisher Scientific Inc.
Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma Aldrich
Tetramethylethyldiamin (TEMED) C ₆ H ₁₆ N ₂	Carl Roth GmbH
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Th. Geyer

3.1.3 Puffer, Lösungen, Nährmedien und Gele

Für die Versuche wurden die in Tabelle 6 aufgelisteten Puffer, Lösungen, Nährmedien und Gele eingesetzt. Eine Aufstellung der dazugehörigen Rezepturen findet sich im Anhang 2.

Tabelle 6: **Verwendete Puffer, Lösungen, Medien und Gele**

Bezeichnung
AK-Puffer, pH 7,6
Anodenpuffer, pH 7,8
Blockierungslösung (Dot Blot)
Blockierungslösung (Western Blot)
Brillantgrün mit Wasser, pH 7,0

Bezeichnung

Casein-Soja-Pepton-Bouillon, pH 7,3

Citratpuffer, pH 3,5

Elutionspuffer, pH 2,75

Gelfuß

Gepuffertes Peptonwasser, pH 7,2

Kathodenpuffer, pH 8,5

Lactose Bouillon, pH 6,9

Magermilch mit Brillantgrün, pH 7,0

Nährbouillon, pH 7,4

Natriumhydrogencarbonatlösung

Neutralisationspuffer, pH 8,75

PBS, pH 7,6

PBS/T (PBS + Tween 20), pH 7,6

PBS-1, pH 7,6

Ringerlösung mit Brillantgrün, pH 7,0

Sammelgel

Sammelgelpuffer, pH 6,8

TBS, pH 7,6

TBS/T (TBS + Tween 20), pH 7,6

Trenngel

Trenngelpuffer, pH 8,8

Waschpuffer, pH 7,6

3.1.4 Bakterienstämme

Die für die Versuche eingesetzten Salmonellen-Teststämme orientierten sich an hygienisch bedeutsamen Serovaren. Zudem wurden weitere Vertreter der Familie der *Enterobacteriaceae* und zusätzlich Nicht-*Enterobacteriaceae*-Stämme gewählt, die zum Teil ebenfalls ein Typ-III-Sekretionssystem ausbilden (*Yersinia* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli* und *Pseudomonas* spp.).

Tabelle 7: **Ausgewählte Prüfstämme zum Nachweis der Sezernierung von SipC in Voranreicherungsmedien**

lfd. Nummer	Serovar bzw. Species	Bezeichnung des Stammes
<i>Salmonella</i>		
1	<i>Salmonella enterica</i> ser. Gallinarum	ATCC 9184, DSM 4883
2	<i>Salmonella enterica</i> ser. Choleraesuis	ATCC 13312, DSM 14846
3	<i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium	ATCC 14028, DSM 19587
4	<i>Salmonella enterica</i> ser. Senftenberg	ATCC 43845, DSM 10062
5	<i>Salmonella enterica</i> ser. Enteritidis	ATCC 13076, DSM 17420
6	<i>Salmonella enterica</i> ser. Heidelberg	ATCC 8326, DSM 9379
7	<i>Salmonella arizonae</i> ser. 51:Z ₄ ,Z ₂₃ :-	ATCC 13314, DSM 9386
andere <i>Enterobacteriaceae</i>		
8	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922, DSM 1103
9	<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090, DSM 30039
10	<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 29930, DSM 5570
11	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	ATCC 29833, DSM 8992
nicht <i>Enterobacteriaceae</i>		
12*	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, DSM 1128
13**	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923, DSM 1104

* kein Einsatz im LFA, **kein Einsatz im ELISA

3.1.5 Antikörper

Tabelle 8: **Verwendete Antikörper**

Bezeichnung	Hersteller
pAK P1 (U703/89420)	BIOSERV Analytik und Medizinprodukte GmbH
pAK P2 (U703/89421)	BIOSERV Analytik und Medizinprodukte GmbH
pAK P3 (U703/89422)	BIOSERV Analytik und Medizinprodukte GmbH
pAK P4 (U703/89423)	BIOSERV Analytik und Medizinprodukte GmbH
pAK P5 (U703/89424)	BIOSERV Analytik und Medizinprodukte GmbH
Anti-Kaninchen-IgG	Sigma Aldrich
Anti-Kaninchen-IgG POD	GE Healthcare UK Limited, Thermo Fisher Scientific Inc.
pAK gegen das Gesamt-SipC	antibodies-online GmbH
mAK P1 (BSR1-7C6G6)	Biometec GmbH
mAK P2 (BSR3-2C3F12)	Biometec GmbH
mAK P3 (BSR2- 8F2E1)	Biometec GmbH
mAK gegen das Gesamt-SipC	antibodies-online GmbH
Anti-Maus-IgG	Sigma Aldrich

3.2 Methoden

3.2.1 Präparation des Antigens

Da das native SipC-Protein nicht in gereinigter Form vorlag und zudem eine Überschneidung mit bestehenden Patenten vermieden werden sollte, wurden AK gegen fünf Teilsequenzen des SipC-Proteins generiert.

Die strukturanalytische Analyse der Aminosäuresequenz des SipC-Proteins in Bezug auf besonders immunogene Bereiche erfolgte durch die BIOSYNTAN GmbH, Berlin. Mittels numerischer Methoden von Parker et al. (1986), Karplus und Schulz (1985) sowie Kyte und Doolittle (1982) wurden im Protein fünf hochantigene Areale ermittelt

(Software: PCOM von CoshiSoft/PeptiSearch Arizona USA). Identifiziert wurden folgende Aminosäuresequenzen:

1. Der Proteinabschnitt 363-378 mit der Sequenz
VASTASDEARESSRKS
2. Der Proteinabschnitt 15-30 mit der Sequenz
NNHSVENSSQTASQSV
3. Der Proteinabschnitt 343-357 mit der Sequenz
GQYAATQERSEQQIS
4. Der Proteinabschnitt 276-289 mit der Sequenz
LGIKDSNKQISPEH
5. Der Proteinabschnitt 246-260 mit der Sequenz
LNMKKTGTDATKNLN

Im Gesamtprotein sind die Peptidabschnitte wie folgt angeordnet:

10	20	30	40	50	60
MLISNVGINP	AAYLNNHSVE	NSSQTASQSV	SAKDILNSIG	ISSSKVSDLG	LSPTLSAPAP
70	80	90	100	110	120
GVLTQTPGTI	TSFLKASIQN	TDMNQDLNAL	ANNVTTKANE	VVQTQLREQQ	AEVGKFFDIS
130	140	150	160	170	180
GMSSSAVALL	AAANTLMLTL	NQADSKLSGK	LSLVSFDAAK	TTASSMMREG	MNALSGSISQ
190	200	210	220	230	240
SALQLGITGV	GAKLEYKGLQ	NERGALKHNA	AKIDKLTTES	HSIKNVLNGQ	NSVKLGAEGV
250	260	270	280	290	300
DSLKSLNMKK	TGTDATKNLN	DATLKSNAQT	SATESLGIKD	SNKQISPEHQ	AILSRLLESV
310	320	330	340	350	360
ESDIRLEQNT	MDMTRIDARK	MQMTGDLIMK	NSVTVGGIAG	ASGQYAATQE	RSEQQISQVN
370	380	390	400		
NRVASTASDE	ARESSRKS	TS	LIQEMLKTME	SINQSKASAL	AAIAGNIRA

Abbildung 8: Anordnung der ausgewählten Peptidsequenzen im SipC-Protein

Die Synthese der fünf Peptide erfolgte ebenfalls durch die BIOSYNTAN GmbH. Um die Peptide über eine SH-Gruppe an übliche Carriersubstanzen binden zu können, wurde ein Cystein-Rest eingebaut.

Die Kopplung der Peptide an das Trägerprotein KLH wurde durch die BIOGENES GmbH, Berlin durchgeführt. Nach Rehydrierung konnten die gekoppelten Peptide für die Immunisierung verwendet werden.

3.2.2 Herstellung polyklonaler Antikörper

3.2.2.1 *Injektion der Antigene*

Für die Herstellung der pAK wurden Kaninchen der Rasse Weißer Neuseeländer mit den im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Peptiden immunisiert. Es wurden fünf Kaninchen mit je einem der Immunogene behandelt. Dazu wurden 0,4 mg des jeweiligen lyophilisierten, an KLH gekoppelten Peptids in 0,2 ml sterilem Phosphatpuffer gelöst und mit 0,2 ml komplettem oder inkomplettem Freundschem Adjuvans emulgiert. Die Emulsion wurde zu je 100 µl an vier Stellen subkutan in den Rücken injiziert. Für die Primärimmunisierung wurde das komplette Adjuvans verwendet, für die Folgeinjektionen das inkomplette. Die Immunisierung erfolgte nach dem 63-Tage Protokoll. Die Blutentnahmen erfolgten nach 3 Immunisierungen am Tag 35 und nach zwei weiteren Immunisierungen am 63. Tag.

3.2.2.2 *Präparation der Seren*

Nach der Blutentnahme wurde das Blut zunächst für 2 h bei 37 °C und dann über Nacht bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurde es für 10 min mit 2770 g zentrifugiert, das Serum abpipettiert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

3.2.3 Affinitätsreinigung der AK aus dem Serum

Um die gewonnen Antikörper für diagnostische Zwecke einsetzen zu können, bedarf es einer Reinigung aus Serum oder Zellkulturmedium. In vorliegender Arbeit wurde die Affinitätschromatografie für diese Reinigung eingesetzt. Dabei wurden im ersten Schritt alle Immunglobuline unspezifisch aus den Kaninchenseren mittels Protein A

isoliert, woraufhin im zweiten Schritt die Aufreinigung der AK erfolgte, die spezifisch gegen das jeweilige Antigen P1 bis P5 gerichtet waren.

3.2.3.1 Protein A Säule

Das Serum der mit den Peptiden immunisierten Kaninchen wurde zunächst über die Protein-A-Säule HiTrap Protein A von GE Healthcare aufgereinigt. Die Methode beruht auf einer reversiblen Adsorption eines Antikörpers (IgG) an eine Matrix. Die Matrix ist hierbei eine quervernetzte Agarose (Sepharose), die mit Protein A beschichtet ist. Protein A ist ein Oberflächenprotein aus *Staphylococcus aureus* mit der Eigenschaft, Immunglobuline, vor allem IgG, zu binden. Protein A weist eine hohe Affinität zu den Fc-Regionen der Immunglobuline auf. Die Bindung zwischen Antikörper und Protein A ist durch eine Veränderung des pH-Wertes in den sauren Bereich wieder lösbar.

Die erforderliche Mengen an PBS und Citratpuffer wurden zunächst sterilfiltriert (0,2 µm Filter). Die Säule wurde zweimal mit 7 ml PBS konditioniert, wobei die Flüssigkeit vollständig einlaufen musste. 1 ml filtriertes Serum wurde auf die Säule gegeben. Die Spritze und der Filter wurden mit 1ml PBS gespült und ebenfalls auf die Säule gegeben. Die Säule wurde anschließend dreimal mit 7 ml PBS gewaschen. Zwischenzeitlich wurden in ein verschließbares 15 ml Röhrchen 0,5 ml 1 mol/l Natriumhydrogencarbonat-Lösung als Eluatvorlage eingefüllt. Zunächst wurden 2,1 ml Citratpuffer auf die Säule gegeben und einlaufen gelassen, anschließend 3,1 ml Citratpuffer, wobei letztere Menge mit dem mit Eluatvorlage vorbereiteten Röhrchen aufgefangen wurde. Mit weiteren 5 ml Citratpuffer wurde die Säule vollständig eluiert. Die Säule konnte für einen weiteren Lauf genutzt werden, nachdem sie zweimal mit 7 ml PBS gewaschen wurde.

Zur Lagerung wurde die Säule zweimal mit 7 ml PBS mit 0,02 % Natriumazid gespült, wobei die letzte Puffermenge nicht vollständig durchläuft. Bei 2 ml Überstand wurde die Säule oben und unten verschlossen und aufrecht stehend im Kühlschrank gelagert.

Jede Charge bzw. jedes einzelne Eluat wurde auf den Proteingehalt untersucht (siehe Kapitel 4.1.1).

3.2.3.2 Spezifische Aufreinigung des IgG über SulfoLink® Säule

Da unabhängig von ihrer Antigenspezifität alle IgG-Moleküle einer Probe mit Protein A aufgereinigt wurden, erfolgte ein zusätzlicher, spezifischer Reinigungsschritt. Bei der spezifischen Aufreinigung wird das Antigen, gegen das der gewünschte AK gerichtet ist, an eine Matrix kovalent gebunden. Diese Matrix wird dann mit der antikörperhaltigen Lösung inkubiert, wobei die spezifischen Antikörper an die Matrix binden. Nach mehreren Waschschritten können die gebundenen Antikörper durch Zugabe eines Puffers wieder eluiert werden.

Die spezifische Reinigung erfolgte mit dem „SulfoLink® Immobilization Kit for Peptides“ der Firma Thermo Scientific. Dazu wurde gemäß Abbildung 9 zunächst je Säule eines der synthetisierten Peptide über den Sulfhydrylrest an die Säulenmatrix (Agarose) gebunden. Danach konnte das immobilisierte Peptid für die Aufreinigung des spezifischen AK genutzt werden.

Die Immobilisierung sowie die Affinitätsreinigung erfolgten nach Anleitung des Herstellers (siehe Anhang 3).

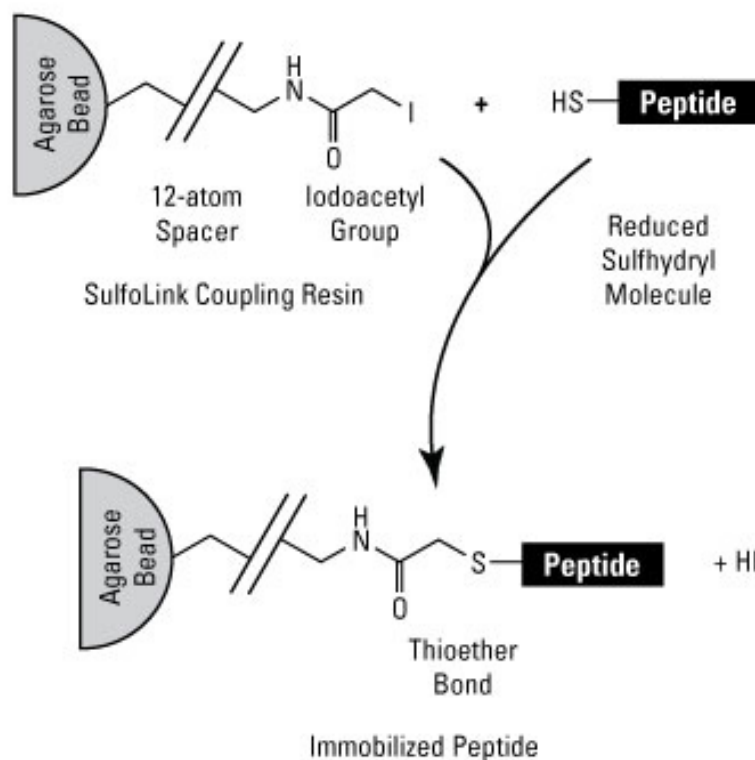


Abbildung 9: **Peptid-Immobilisierung mittels SulfoLink® Kopplungsreagenzien** (Thermo Fisher Scientific Inc.), Sulfhydrylgruppen reagieren mit Iodacetylgruppen und formen kovalente Bindungen mit Peptiden

3.2.4 Antikörpercharakterisierung

3.2.4.1 *Proteinbestimmung*

Eine Quantifizierung der Proteinmengen erfolgte nach STOSCHEK (1990) spektrophotometrisch über die Absorption der aromatischen Aminosäurereste (besonders Tryptophan und Tyrosin) bei 280 nm.

Obwohl in der Praxis oft eine Extinktion von 1,0 bei 280 nm mit einer Proteinkonzentration von 1 mg ml⁻¹ gleichgesetzt wird, stimmt dieses nur in wenigen Fällen mit der tatsächlichen Konzentration überein. In Abhängigkeit der Anzahl und räumlichen Anordnung der aromatischen Aminosäurenreste wurde die gemessene Absorption daher um den Extinktionskoeffizienten von IgG korrigiert. Die Berechnungsformel der Proteinkonzentration lautet:

$$\beta = \frac{A_{280} \cdot d}{\varepsilon}$$

Dabei ist:

β = Proteinkonzentration in mg ml⁻¹

A_{280} = Absorptionswert bei 280 nm Wellenlänge

d = Schichtdicke der Messküvette (hier 1 cm)

ε = Extinktionskoeffizient des Antikörperisotyps IgG (hier 1,37)

3.2.4.2 *Nachweis der spezifischen Bindung der pAK*

Der Nachweis der spezifischen Bindung der jeweiligen pAK wurde in Einfachbestimmung (pAK gegen P1) bzw. Doppelbestimmung (pAK gegen P2 bis P5) mittels Dot Blot durchgeführt. Alle pAK wurden zusätzlich im Western Blot getestet.

3.2.4.2.1 Dot Blot

Mit Hilfe der Dot Blot Methode können Proteine auf einer Membran nachgewiesen werden, wobei die Proteinproben direkt punktförmig (= Dot Blot) mit einer speziellen Dot Blot Apparatur aufgetragen werden. Die aufgetragenen Flüssigkeiten werden dabei mit Hilfe einer Vakuumpumpe durch die Membran gesaugt.

Die Apparatur wurde nach Anleitung des Herstellers zusammengesetzt. Je Kavität wurden zunächst 100 µl TBS zum Spülen einpipettiert. Anschließend wurden die gewünschten Kavitäten mit 200 µl Antigenlösung (Konzentration 0,4 ml l⁻¹) befüllt. Nachdem die Proben vollständig durchgezogen waren, erfolgte eine erneute Spülung der Kavitäten mit 200 µl TBS. Nach Durchlauf des TBS wurde die Apparatur geöffnet, die Probenkassette entfernt und die Membran entnommen. Diese wurde in 100 ml Blockierungslösung bei RT abgesättigt und auf einem Schüttler für 1 h inkubiert.

Nach dem Blocken der Membran wurde diese zunächst in ein Gefäß mit TBS/T überführt und für 5 min unter leichtem Schütteln gewaschen. Dieser Vorgang wurde 2 weitere Male wiederholt. Folgend wurde die Membran für 1 h bei RT unter Schütteln mit dem primären AK gegen das jeweilige Peptid bzw. den AK-Pool aus pAK P1 bis pAK P5 inkubiert (4 ml Lösung, 1:10 verdünnt in AK-Puffer). Die Lösung wurde abgegossen, die Membran dreimal mit TBS/T für 5 min unter Schütteln gewaschen. Daraufhin wurde die Membran in ein Gefäß mit der sekundären AK-Lösung überführt. Hierbei handelte es sich um Anti-Kaninchen-IgG POD, 1:1000 verdünnt in AK-Puffer. Nach einer Stunde Inkubation unter Schütteln bei RT wurde zweimal je 5 min mit TBS/T gewaschen, ein drittes Mal mit TBS ohne Tween. Anschließend wurde TMB auf die Membran gegeben, das als Substrat für die POD diente. Durch die Substratumsetzung erfolgte ein Farbumschlag von farblos zu blau an der Stelle, an der der 2. AK gebunden hatte. Nach Sichtbarwerden der Bindungsstellen wurde die Reaktion mit Aqua bidest. abgestoppt.

3.2.4.2.2 Western Blot

Proteine werden vor einem Western Blot zunächst mittels SDS-Page nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, dann auf eine Membran transferiert und anschließend durch Antikörperbindung detektiert.

SDS ist ein anionisches Detergenz, welches sich an die Proteine anlagert, sie denaturiert und proportional zu ihrer Größe mit einer negativen Ladung versieht. Die Eigenladungen der Proteine werden dadurch überdeckt. Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine werden durch Aufspaltung der Wasserstoffbrücken und Streckung der Moleküle aufgelöst. Die Disulfidbrücken (Schwefelbrücken zwischen Cysteinen) können durch SDS nicht gespalten werden. Diese wurden durch Zugabe

von β -Mercaptoethanol im Probenpuffer aufgebrochen. Durch die Auffaltung und Streckung der Aminosäureketten unterscheiden sich die SDS-Komplexe verschiedener Proteine nur noch in ihrer Größe und können in der Gelelektrophorese aufgetrennt werden. (LUTTMANN et al., 2014; THERMO FISHER SCIENTIFIC INC., 2014; RAEM und RAUCH, 2007)

Für die Gelelektrophorese wurde die SDS-Page nach LAEMMLI (1970) angewandt. Die Porengröße des Gels wurde an den Molekulargewichtsbereich der Proben von ca. 20 kDa angepasst und musste dementsprechend gering sein. Es wurde ein 20 %iges Trenngel verwendet, welches mit einem großporigen 5 %igen Sammelgel überschichtet wurde.

Als Markerproteinlösung wurde Roti[®]-Mark PRESTAINED eingesetzt. Anhand des Markers lässt sich später das Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine abschätzen. Die Gelbeladung erfolgte nach folgendem Schema:

1. Tasche – leer
2. Tasche – Marker (8 μ l)
3. Tasche – OVA (15 μ l)
4. Tasche – P1, P2, P3, P4 oder P5 (15 μ l)
5. Tasche – P1, P2, P3, P4 oder P5 (15 μ l)
6. Tasche – RSA (15 μ l)
7. Tasche – Marker (8 μ l)
8. – 10. Tasche – leer

Vor der Separation wurden die Proben vorbereitet, indem sie mit jeweils 60 μ l in Roti[®]-Load 1 verdünnt, gut durchmischt und kurz zentrifugiert, anschließend 5 min bei 95 °C denaturiert, wieder gemischt und zentrifugiert wurden.

Nach Beendigung der SDS-Page wurde das Gel vorsichtig entnommen, die Taschen sowie der Gelfuß entfernt und das Trenngel kurz in Aqua bidest. gewaschen.

An die Auftrennung durch SDS-Page schloss sich die Übertragung auf eine PVDF-Membran an. Dazu wurde das Gel auf eine mit Methanol aquilibrierte PVDF-Membran gelegt, die zuvor auf Größe des Gels zugeschnitten wurde. Nach dem Benetzen mit Methanol wurde die Membran für 2 min in Aqua bidest. getränkt und folgend für 5 min in Anodenpuffer inkubiert. Das Gel sowie die Membran wurden luftblasenfrei zwischen je drei in Anoden- bzw. Kathodenpuffer getränkten Filterpapieren

platziert, indem die Luft mit einer Walze unter leichtem Druck aus dem entstandenen Sandwich entfernt wurde. Der Blot erfolgte in einer Semi-Dry-Blotting Apparatur für 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 2 mA pro cm² Gel durchgeführt

Nach Entfernen der Membran wurde diese sofort in 3 %igem (w/v) Magermilchpulver über Nacht inkubiert, um freie Proteinbindungsstellen auf der Membran zu blocken. Vor Zugabe des primären AK erfolgte ein dreimaliges Waschen à 15 min mit WP. Die Inkubation des 1:10 in 1 % Magermilchlösung in TBS/T verdünnten pAK gegen das jeweilige Peptid (P1 bis P5) erfolgte bei RT für 1 h unter schütteln. Dreimaliges Waschen mit WP entfernte ungebundene AK. Anschließend wurde die Membran mit dem sekundären AK auf die gleiche Weise inkubiert. Hierbei handelte es sich um Anti-Kaninchen-IgG POD in einer 1:1000 Verdünnung mit 0,5 % BSA in WP.

Nach wiederholtem dreimaligen Waschen in WP erfolgte durch die Zugaben von 5 ml TMB die Aktivierung der am sekundären AK gekoppelten Peroxidase. Durch die Oxidation von TMB erfolgt ein Farbumschlag von farblos zu blau an der Stelle, an der der 2. AK gebunden hat. Nach ausreichend sichtbarer Farbreaktion wurde die Reaktion mit Aqua bidest. gestoppt.

3.2.4.2.3 Nachweis der spezifischen Bindung der pAK mittels ELISA

Zur Überprüfung der Fähigkeit zur spezifischen Bindung der hergestellten pAK wurde ein indirekter ELISA gewählt. Zur Antigengewinnung wurde jeweils eine Kultur (Ausgangskeimzahl ca. 50 KbE) der Bakterienstämme *Salmonella* ser. Choleraesuis (S.C.) und *Salmonella* ser. Typhimurium (S.T.) sowie *Escherichia coli* (E.c.) (siehe Kapitel 3.1.4) in gepuffertem Peptonwasser angesetzt. Zunächst wurden auf drei autoklavierte Erlenmeyerkolben je 45 ml GPW aliquotiert und mit jeweils einem Bakterienstamm beimpft und über Nacht im Schüttelwasserbad bei 210 U min⁻¹ und 37 °C inkubiert. Nach 16 h Bebrütung wurde die Zellsuspension bei 3500 g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, der Überstand für Beschichtung der ELISA-Platte verwendet. Als Negativkontrolle diente nicht beimpftes gepuffertes Peptonwasser.

Alle Volumenangaben beziehen sich auf jeweils ein Well der ELISA-Platte. Zwischen allen Inkubationsschritten wurde die Platte dreimal mit 200 µl WP gewaschen.

Zur Antigen-Beschichtung wurden jeweils 50 µl des Überstandes pro Well über Nacht nach Schema in Tabelle 9 eingesetzt. Nach Ausklopfen der Platten wurden die nicht abgesättigten Bindungsstellen durch 30 min Inkubation bei RT mit 100 µl 3 % MMP in PBS blockiert. Die Inkubation der verdünnten Primärantikörper (je 50 µl in KVP) erfolgte für 1 h bei 37 °C in feuchter Kammer.

In KVP verdünnte (1:1000), POD markierte Anti-Spezies-Sekundärantikörper wurden anschließend gleichermaßen inkubiert. Gebundene Antikörper wurden durch POD-vermittelten Farbumschlag des TMB-Substrats (100 µl) für 20 min bei RT nachgewiesen. Nach Abstoppen der enzymatischen Reaktion durch 100 µl 0,25 M Schwefelsäure werden die Extinktionen mittels Photometrie durch Subtraktionswellenlängenmessung bei 450 nm minus 620 nm optisch bestimmt.

Tabelle 9: ELISA-Pipettierschema zum Nachweis der spezifischen Bindung der pAK P2 bis P5 an Kulturüberständen

	1.AK 1:10					1.AK 1:50			1.AK 1:100		
	H ₂ O	GPW	E.c.	S.C.	S.T.	E.c.	S.C.	S.T.	E.c.	S.C.	S.T.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	Blank	NK									
B	Blank	NK									
C	Blank	NK									
D	Blank	NK									
E	Blank	NK									
F	Blank	NK									
G	Blank	NK									
H	Blank	leer									
	pAK P2	pAK P3	pAK P4	pAK P5							

GPW = gepuffertes Peptonwasser, E.c. = *Escherichia coli*, S.C. = *Salmonella* ser. Choleraesuis, S.T = *Salmonella* ser. Typhimurium, NK = S.T. ohne den 1. pAK (nur KVP), NK = Negativkontrolle, unv. = unverdünnt, Blank = leer

3.2.5 Produktion monoklonaler Antikörper

Durch die in Kapitel 3.2.2 beschriebene Methode konnte nur wenig polyklonales AK-Material einer Charge generiert werden. Nach jedem Verbrauch einer Charge hätte wieder ein Versuchstier immunisiert werden müssen, welches jedoch einen nicht identischen Satz Antikörper bildet. Dieser Umstand in Verbindung mit der steigenden

Verbrauchsmenge an AK für die angelegten Versuche machte es notwendig, auch mAK zu produzieren. Für die Herstellung mAK wurden drei der genannten Peptide (P1, P2 und P3) sowie das gesamte SipC-Protein verwendet.

Die Produktion der mAK erfolgte durch die Biometec GmbH, Greifswald. Die Antikörper lagen in bereits gereinigter Form vor.

3.2.6 Voranreicherung der Bakterienkulturen für den Dot Blot

Von den Teststämmen aus Kapitel 3.1.4 wurde eine Ausgangskeimzahl von ca. 50 KbE in jeweils 20 ml gepuffertes Peptonwasser gegeben und bei 37 °C 24 h inkubiert. Vor der Verwendung wurden die Überstände abzentrifugiert (3500 g, 30 min, 4 °C) und filtriert.

3.2.7 Voranreicherung der Bakterienkulturen für ELISA zum Nachweis der Sezernierung von SipC in Voranreicherungsmedien

Von den Teststämmen aus Kapitel 3.1.4 wurde eine Ausgangskeimzahl von ca. 50 KbE in jeweils 20 ml Voranreicherungsmedium gegeben und bei 37 °C unter Schütteln (150 U min^{-1}) bis zu 20 h inkubiert. Die Kulturüberstände wurden zu unterschiedlichen Zeiten (8 h, 9 h, 10 h und 20 h), entnommen und bis zur Verwendung bei -18 °C gelagert. Vor der Verwendung wurden die Überstände auf RT erwärmt und abzentrifugiert (3500 g, 30 min, 4 °C).

3.2.8 Voranreicherung der Bakterienkulturen für den LFA zum Nachweis von Salmonellen aus Kulturüberständen

Die Voranreicherung der Kulturen für den Einsatz im Lateral Flow Assay fand unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus dem Versuch zur optimalen Sezernierung von SipC in Kulturüberstände (siehe Kapitel 4.2) ausschließlich in Casein-Soja-Pepton-Bouillon über 20 h analog der Bedingungen des vorhergehenden Kapitels statt. Allerdings wurde nicht zentrifugiert und filtriert, sondern die Bouillon wurde direkt aufgetragen, da alle Arbeitsschritte unter einer Sicherheitswerkbank ausgeführt werden konnten. Da die Testdurchführung des LFA an unterschiedlichen Tagen stattfand,

wurde die Bouillon gegebenenfalls bis zur Verwendung bei -18 °C gelagert. Vor der Verwendung wurden die Überstände auf RT erwärmt.

3.2.9 ELISA zum Nachweis der Sezernierung von SipC in Voranreicherungsmedien

Für die Erprobung der optimalen Sezernierung von SipC wurden sieben flüssige Standardnährmedien für die Voranreicherung von Salmonellen verwendet: Lactose-Bouillon (LB), Casein-Soja-Pepton-Bouillon (Caso), Nährbouillon (NB), gepuffertes Peptonwasser (GPW), Ringerlösung mit Brillantgrün (RiB), Brillantgrün mit Wasser (WB) und Magermilch mit Brillantgrün (MMB) (nach D'AOUST, 1981).

Zum Nachweis diente ebenfalls ein indirekter ELISA (siehe Kapitel 3.2.4.2.3). Alle Volumenangaben beziehen sich auf jeweils ein Well der ELISA-Platte. Zwischen allen Inkubationsschritten wurde die Platte dreimal mit 200 µl WP gewaschen.

Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden mit 50 µl des jeweiligen unverdünnten Kulturüberstandes beschichtet und bei 4 °C über Nacht (ca. 14 h) inkubiert, gewaschen und mit 100 µl 3 % MMP in PBS bei RT 1 h geblockt.

Als Primärantikörper diente ein kommerziell erhältlicher pAK gegen SipC, der zu jeweils 100 µl in einer Verdünnung von 1:2000 in 0,5 % BSA in PBS in die Vertiefungen der Platte gegeben wurde. Als Negativkontrolle wurden 100 µl des jeweiligen Voranreicherungsmediums ohne Bakterienstämme (ohne Antigen) in je drei Kavitäten pro Reihe aufgegeben. Eine Kavität pro Spalte diente als Blank (Aqua bidest.).

Tabelle 10: **Pipettierschema zum Nachweis der Sezernierung von SipC in Kulturüberstände mittels ELISA**

	Serovar bzw. Species A				Negativkontrolle			Serovar bzw. Species B			
	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8 h	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h
LB											
Caso											
NB											
GPW											
RiB											
WB											
MMB											
Blank	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O

Die Inkubationszeit betrug 1 h bei 37 °C in feuchter Kammer, um die Platten vor Austrocknung zu schützen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper, 50 µl Anti-Kaninchen-IgG, 1:2000 in 0,5 % BSA in PBS, einpipettiert und erneut inkubiert. Im nächsten Schritt wurden je 100 µl TMB-Lösung in jede Kavität gefüllt und für 20 min bei RT inkubiert. Das Stoppen der Enzym-Substrat-Reaktion erfolgte mit 100 µl 0,25 M Schwefelsäure. Die Extinktionsmessung der einzelnen Vertiefungen wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm bei einer Referenzwellenlänge von 630 nm im ELISA-Reader durchgeführt. Der Mittelwert der Absorptionen des Blank wurde von den Messwerten abgezogen.

3.2.10 LFA zum Nachweis von Salmonellen aus Kulturüberständen

3.2.10.1 *Blotting der Membran und Zusammenfügen der Einzelkomponenten*

Die eingesetzten mAK wurden sowohl für die Bildung der Testlinie genutzt (unverdünnt) als auch für den Detektor-AK mit kolloidalem Gold konjugiert. Das Konjugat wurde durch das Moskauer Scientific Research Institute of Human Morphology mit 40 nm kolloidalen Goldpartikeln hergestellt (OD 50). Die Kontrolllinie wurde mittels Anti-Maus-IgG (unverdünnt) generiert.

Die AK wurden manuell mit Hilfe einer Pipette auf der Nitrozellulosemembran immobilisiert. Test- und Kontrolllinie hatten einen Abstand von ca. 5 mm. Anschließend wurde die Membran bei 37 °C für ca. 2 h getrocknet. Die Testdurchführung erfolgte am Tag der Herstellung des LFA.

Auf dem oberen Streifen der kunststoffverstärkten Membran wurde ca. 2 mm überlappend das Sample Pad fixiert. Auf der unteren Klebefläche wurde das Absorbent-Pad befestigt. Die so vorbereitete Membran wurde in ca. 5 mm breite Streifen geschnitten. Der fertige Streifen wurde anschließend in eine Kunststoffkassette eingelegt.

3.2.10.2 *Testdurchführung*

Um den Test zu starten, wurden 100 µl des Analyten in einem Eppendorfgefäß mit 20 µl goldmarkiertem Antikörper gemischt und 100 µl dieses Konjugates in die vorgesehene Probenvertiefung der Kunststoffkassette gegeben. Die Ausbildung der Kontrolllinie zeigte sich bereits kurz nach deren Passieren (nach ca. 2 min). Da eine deutliche Ausbildung der Testlinie unterschiedlich lange dauerte (2...10 min), wurde das Testergebnis grundsätzlich nach Ablauf von 10 min abgelesen.

4 Ergebnisse

4.1 Eignung der Antikörper

4.1.1 Isolierung der Antikörper

Um die pAK für die Immunaффinitätschromatographie verwenden zu können, mussten diese zunächst aus dem jeweiligen Kaninchenserum isoliert werden. Die Aufreinigung erfolgte in zwei Schritten, zunächst mittels Protein A Säule und anschließend mittels SulfoLink[®] Säule.

Abbildungen 10 zeigt exemplarisch anhand einer Serumaufrreinigung mittels Protein A den Schreibermitlauf, der die UV-Absorption durch die Peptide aufzeichnet (Papervorschub 30 cm). Der erste Peak stellt die Absorption des ungebundenen Serumdurchlaufs, der zweite Peak die Absorption des durch pH-Shift von der Säule gelösten IgG dar.

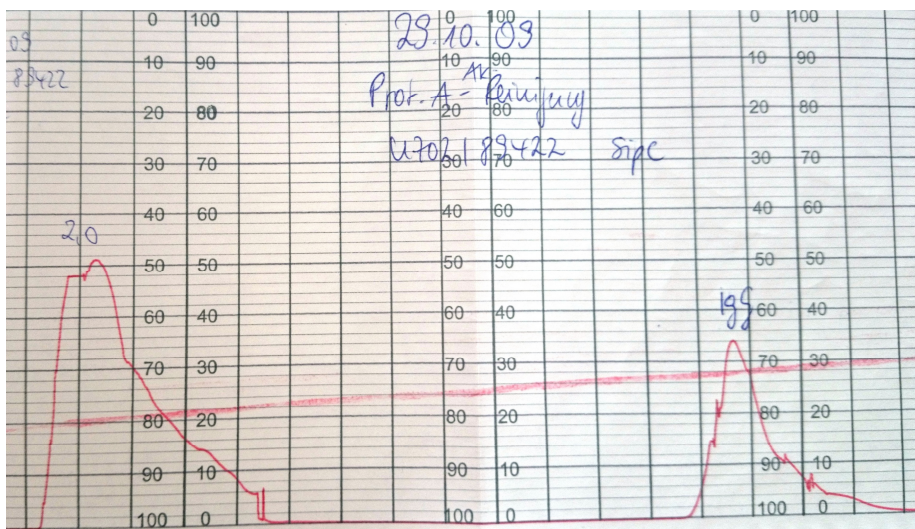


Abbildung 10: Elutionsdiagramm der Protein A Säule, Probe: Kaninchenserum mit pAK gegen P3, 1. Peak: Serum, 2. Peak: IgG

Die Proteinkonzentration der Elutionen aus der Protein A und der SulfoLink[®] Aufreinigung wurde photometrisch bei 280 nm bestimmt. Dieses Verfahren liefert nach LUTTMANN et al. (2014) bei der Aufreinigung von Serum mittels Affinitätschromatographie eine ausreichende Genauigkeit. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass aus den Kaninchenseren nach Protein A Aufreinigung eine Immunglobulinkonzentrationen von maximal $2,8 \text{ mg ml}^{-1}$ erreicht werden konnte. Da-

raus wurden, je nach zur Immunisierung verwendetem Peptid, ca. 2...5 % spezifische AK gewonnen. Dabei war die Menge vom pAK P1 am größten und fiel bis zum pAK P5 ab.

4.1.2 Dot Blot und Western Blot

Die Bestätigung der Bindung der AK an die Peptide wurde mittels Dot Blot und Western Blot geführt. Dabei zeigte sich, dass im Dot Blot alle fünf spezifischen AK an das dazugehörige Peptid binden und keine unspezifischen Bindungen zu den Modellallergenen OVA und RSA auftraten (Abbildungen 11 bis 15).

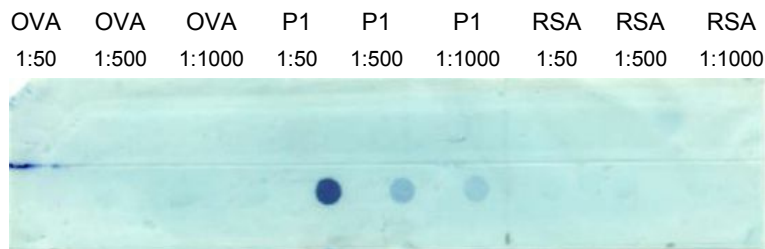


Abbildung 11: **Dot Blot der pAK gegen P1 in verschiedener Verdünnung**, spezifische Bindung an das Antigen in allen drei Verdünnungsstufen

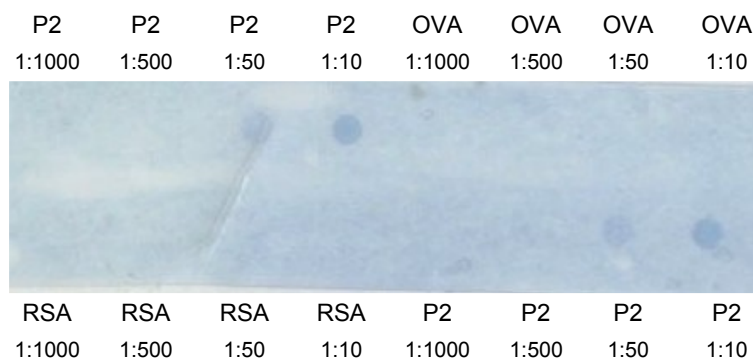


Abbildung 12: **Dot Blot der pAK gegen P2 in verschiedener Verdünnung**, spezifische Bindung an das Antigen in Verdünnungen von 1:10 und 1:50

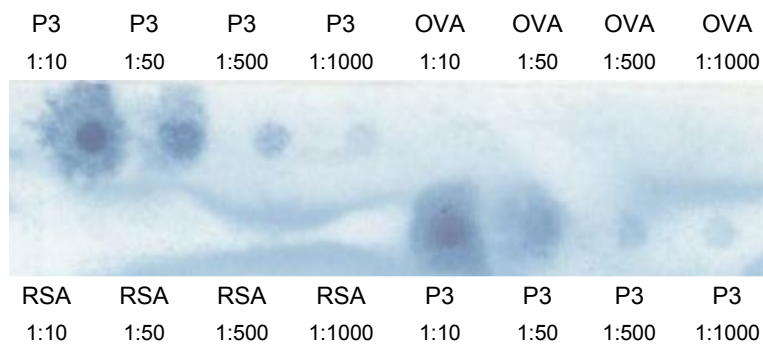


Abbildung 13: **Dot Blot der pAK gegen P3 in verschiedener Verdünnung**, spezifische Bindung an das Antigen in allen vier Verdünnungsstufen

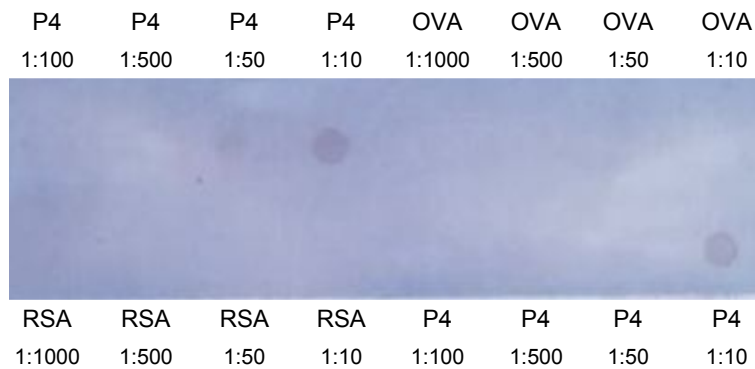


Abbildung 14: **Dot Blot der pAK gegen P4 in verschiedener Verdünnung**, spezifische Bindung an das Antigen in Verdünnung 1:10, sehr schwach bei 1:50

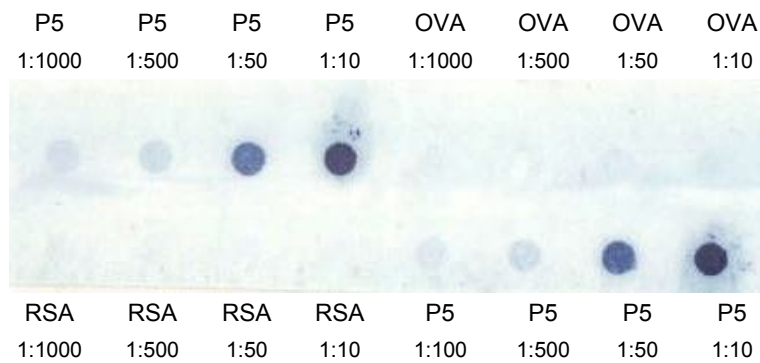


Abbildung 15: **Dot Blot der pAK gegen P5 in verschiedener Verdünnung**, spezifische Bindung an das Antigen in allen vier Verdünnungsstufen

Im Western Blot ließen sich diese Feststellungen nur anhand des pAK P1 bestätigen die restlichen Antikörperlösungen zeigten keine Bindung an das jeweilige Antigen. Aus diesem Grund ist nur der Western Blot des pAK P1 abgebildet (Abbildung 16).

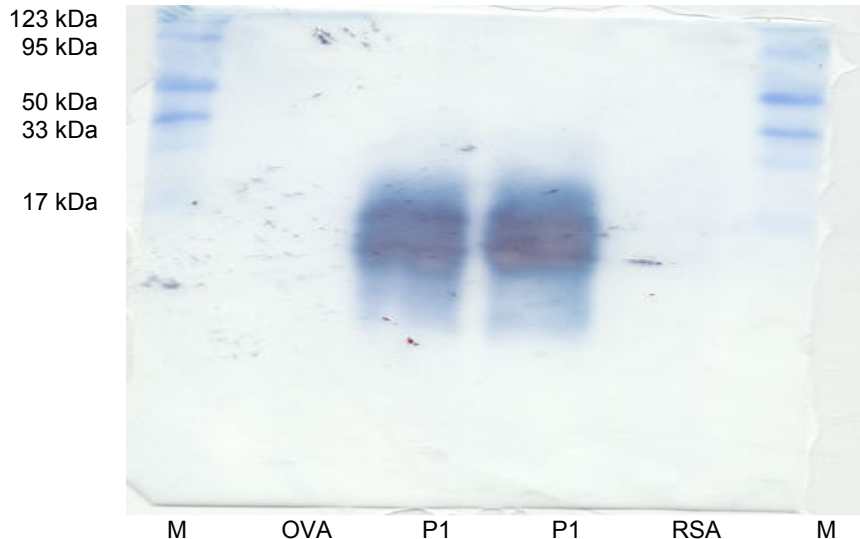


Abbildung 16: **Western Blot des pAK gegen P1**, spezifische Bindung an das Antigen

In der folgenden Abbildung 17 ist ein Dot Blot dargestellt, der die Mischung aller pAK an zentrifugierten und sterilfiltrierten Kulturüberständen testet. Spezifische AK-Reaktionen sind bei Salmonellen zu erkennen, wobei die Probe aus *Salmonella* ser. Typhimurium (S.T.) anscheinend mehr SipC als *Salmonella* ser. Cholerasuis (S.C.) beinhaltet. Reaktionen sind bei *Salmonella* ser. Cholerasuis bei einer Antigen-Verdünnung von 1:10 und 1:50 kaum sichtbar. Bei *Salmonella* ser. Typhimurium zeigte sich hingegen bei 1:10 und 1:50 eine gut sichtbare AK-Reaktion. Keine AK-Reaktion erfolgte bei *Citrobacter freundii* (C.f.) und *Escherichia coli* (E.c.).

Die entstanden untypischen, unregelmäßigen und deutlich kleineren Blots sind auf Unachtsamkeit beim Einpipettieren der Proben bzw. beim Entfernen von Luftblasen mittels Pipettenspitze durch versehentliche Berührung der Membran zurückzuführen (obere Membran bei C.f. in 1:1000 und 1:500 Verdünnung, untere Membran C.f. in 1:50 und 1:1000 Verdünnung sowie E.c. in 1:10 Verdünnung).

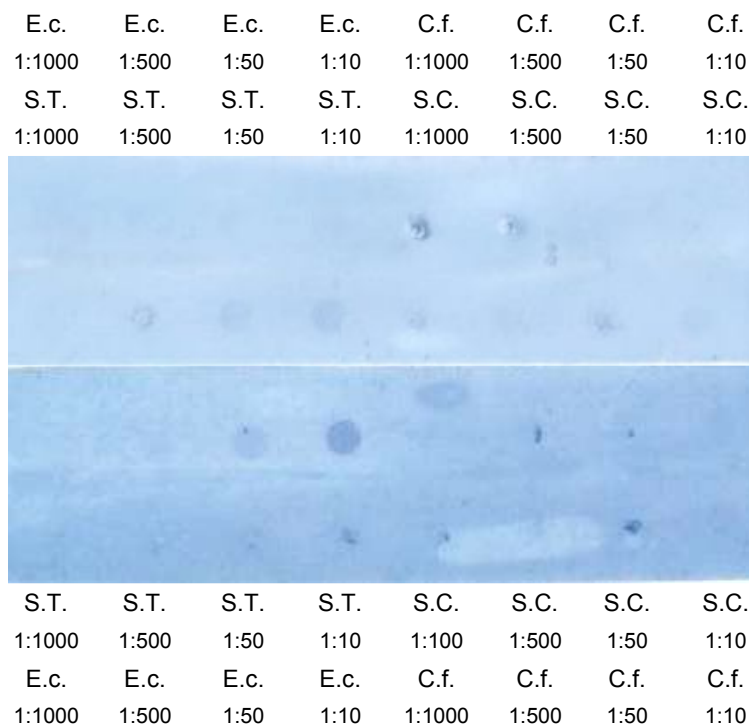


Abbildung 17: Dot Blot (Doppelbestimmung) des AK-Pool aus pAK P1 bis pAK P5 in verschiedenen Verdünnungen anhand von Kulturüberständen

4.1.3 ELISA zum Nachweis der spezifischen Bindung an Salmonellenproben

Da die spezifische Bindung der pAK gegen die Peptide 2 bis 5 im Western Blot nicht nachgewiesen werden konnte, wurde mit den AK ein indirekter ELISA aufgebaut. Der Versuch fand in Doppelbestimmung statt.

Die statistische Auswertung erfolgte, indem zunächst der Mittelwert X_N und die Standardabweichung SD der negativen Kontrollen errechnet wurden.

Um eine Probe als positiv zu werten, musste deren Wert gleich oder größer sein als der Mittelwert der negativen Kontrollen plus die dreifache Standardabweichung (positiv $\geq X_N + 3 \text{ SD}$). Eine Probe wurde als fraglich gewertet, wenn deren Wert gleich oder größer war als der Mittelwert der negativen Kontrollen plus die zweifache Standardabweichung (fraglich $\geq X_N + 2 \text{ SD}$) und kleiner als der Mittelwert der negativen Kontrollen plus die dreifache Standardabweichung (fraglich $< X_N + 3 \text{ SD}$). Eine Probe

wurde als negativ gewertet, wenn deren Wert kleiner war als der Mittelwert der negativen Kontrollen plus die zweifache Standardabweichung ($\text{negativ} < X_N + 2 \text{ SD}$).

Es zeigte sich nur bei zwei der getesteten pAK eine eindeutig positive Reaktion bei *Salmonella* ser. Typhimurium – beim pAK P3 in der 1:10 Verdünnung sowie in der 1:50 Verdünnung und beim pAK P4 in der 1:10 Verdünnung. Kreuzreaktionen zu *Escherichia coli* konnte nicht festgestellt werden, allerdings war auch keine Bindung an den Überstand von *Salmonella* ser. Choleraesuis zu erkennen.

Tabelle 11: Extinktionen im indirekten ELISA zum Nachweis der spezifischen Bindung der pAK P2 bis P5 an Kulturüberstände, Darstellung nach statistischer Auswertung

			1.AK 1:10			1.AK 1:50			1.AK 1:100		
	H ₂ O (Blank)	GPW (NK)	E.c.	S.C.	S.T.	E.c.	S.C.	S.T.	E.c.	S.C.	S.T.
A	-0,024	0,190	0,234	0,231	0,087	0,085	0,059	0,014	0,064	0,054	0,050
B	-0,041	0,200	0,102	0,084	0,126	0,006	0,010	-0,015	0,037	0,010	-0,013
C	-0,026	0,152	-0,008	0,045	1,003	-0,008	0,004	0,304	0,006	0,046	0,205
D	0,033	0,242	0,101	0,018	0,444	0,031	-0,031	0,383	-0,007	-0,011	0,052
E	0,007	0,188	0,116	0,106	0,432	0,020	0,056	0,195	0,007	0,187	0,040
F	0,015	0,183	0,044	0,129	0,359	-0,026	-0,006	0,014	-0,033	0,095	-0,026
G	0,042	0,172	-0,022	-0,017	0,004	-0,035	0,013	-0,008	-0,031	0,217	0,058
H	-0,006	-0,023 (leer)	-0,002	0,005	0,002	-0,023	0,009	0,018	-0,016	0,014	0,021
	positiv		pAK P2	pAK P3	pAK P4	pAK P5					

GPW = gepuffertes Peptonwasser, E.c. = *Escherichia coli*, S.C. = *Salmonella* serv. Choleraesuis, S.T = *Salmonella* ser. Typhimurium

4.2 ELISA zum Nachweis der Sezernierung von SipC in Voranreicherungsmedien

Die ELISA-Versuche fanden in Dreifachbestimmung statt. Die statistische Auswertung erfolgte wie unter Kapitel 4.1.3 beschrieben.

Um die Ergebnisse aus den einzelnen ELISA-Platten miteinander vergleichen zu können, war es bei der Vielzahl an Messungen zusätzlich nötig, die Variationen zwischen den Resultaten der unterschiedlichen Platten und Testzeitpunkte zu korrigieren. Als Grundlage für die vorzunehmende Korrektur wurde der OD-Mittelwert der Blanks (XK_{soll}) aus allen drei zu vergleichenden Platten ermittelt. Aus den OD-Werten der Ansätze der Blanks jeder einzelnen Platte errechnete sich der Mittelwert (XK_{ist}).

Ergaben sich dabei Abweichungen des XK_{ist} vom Wert des XK_{soll} , wurden die Einzelwerte der Proben dieser Platte mit einem Korrekturfaktor (F) multipliziert. Dieser

Korrekturfaktor ermittelte sich wie folgt:
$$F = \frac{XK_{soll}}{XK_{ist}}.$$

Die Ergebnisse nach statistischer Auswertung wurden in Tabelle 12 zusammenfassend dargestellt, es wurden dabei nur die Resultate berücksichtigt, die in allen drei ELISA-Messungen positiv bewertet wurden. Die ausführlichen ELISA-Protokolle können dem Anhang 4 entnommen werden.

In Überständen aus gepuffertem Peptonwasser und Nährbouillon konnte SipC mit dem eingesetzten pAK gegen das Gesamtprotein aus allen Salmonellenproben mit hoher Konzentration nachgewiesen werden. SipC war aus diesen Medien zudem häufig bereits nach 8...10 h detektierbar. Die Extinktionen stiegen daraufhin im Verlauf der Testdauer deutlich an bis zu einem positiven Testergebnis mit Extinktion mehr als 10-fach über der NK. Allerdings zeigten sich mit diesen Medien auch Kreuzreaktionen zu den Nicht-Zielkeimen. Dabei fielen die Extinktionen der Kulturüberstände jedoch deutlich geringer aus und stiegen zudem über die Versuchsdauer von 20 h nicht weiter an. Eine Ausnahme bildete *Escherichia coli*, hier konnten bei zwei der getesteten Nährmedien sogar deutlich steigende Extinktionen gemessen werden. In gepuffertem Peptonwasser wurden nach 20 h Extinktionen dreifach über der NK gemessen, in Lactose-Bouillon nach 20 h sogar mehr als 10-fach über der NK.

Die Voranreicherungsmedien ohne Nährstoffe (Ringer mit Brilliantgrün und Brilliantgrün mit Wasser) lieferten selbst nach 20 h kein deutlich nachweisbares SipC, ebenso das Medium mit Magermilch.

Tabelle 12: **Nachweis von SipC aus Kulturüberständen unterschiedlicher Nährmedien;** Zusammenfassende Darstellung, abgeleitet aus gemessenen ELISA-Extinktionen bei einer Wellenlänge von 450 nm/630 nm (– kein Sip C nachweisbar, + erstmaliges positives Testergebnis; ++ positives Testergebnis mit Extinktion dreifach über der NK, +++ positives Testergebnis mit Extinktion mehr als 10fach über der NK)

	<i>LB</i>	<i>Caso</i>	<i>NB</i>	<i>GPW</i>	<i>RiB</i>	<i>WB</i>	<i>MMB</i>
<i>Salmonella enterica</i> ser. Gallinarum	+++20 h	+20 h	+++20 h	+++20 h	–	–	–
<i>Salmonella enterica</i> ser. Choleraesuis	+8 h	+8 h ++20 h	+10 h +++20 h	+10 h +++20 h	+8 h	+8 h	+9 h
<i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium	+8 h ++20 h	+8 h +++20 h	+8 h +++20 h	+8 h +++20 h	–	–	–
<i>Salmonella enterica</i> ser. Senftenberg	++20 h	+8 h +++20 h	+++8 h	+++9 h	+20 h	+20 h	+20 h
<i>Salmonella enterica</i> ser. Enteritidis	+9 h +++20 h	+9 h +++20 h	+8 h +++20 h	+8 h +++10 h	–	–	+20 h
<i>Salmonella enterica</i> ser. Heidelberg	+8 h ++20 h	++8 h	++9 h +++20 h	+8 h +++20 h	–	–	–
<i>Salmonella arizonae</i> ser. 51:Z ₄ ,Z ₂₃ :-	+20 h	+++20 h	++9 h +++10 h	++10 h +++20 h	–	–	–
<i>Escherichia coli</i>	+++20 h	+20 h	+20 h	+8 h ++20 h	–	–	–
<i>Citrobacter freundii</i>	+20 h	+20 h	+8 h	+20 h	–	+20 h	–
<i>Shigella sonnei</i>	+20 h	+8 h	+8 h	+10 h	–	–	–
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	+10 h	+8 h	+8 h	+9 h	–	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+20 h	+10 h	+20 h	+8 h	–	–	–

4.3 LFA zum Nachweis von Salmonellen aus Kulturüberständen

Der Aufbau der LFA und die Testdurchführungen fanden in Doppelbestimmung an unterschiedlichen Tagen statt. Die Versuche wurden visuell ausgewertet. Der Test wurde als funktionsfähig angesehen, wenn nach 10 min auf Höhe der Kontrolllinie eine eindeutige rötlich-violette Färbung auftrat. Eine Probe wurde als positiv bewertet, wenn innerhalb von 10 min sowohl auf Höhe der Testlinie als auch auf Höhe der Kontrolllinie eine eindeutige rötlich-violette Färbung erschien. Eine Probe wurde als negativ bewertet, wenn innerhalb von 10 min auf Höhe der Testlinie keine eindeutige rötlich-violette Färbung erschien und auf Höhe der Kontrolllinie eine eindeutige rötlich-violette Färbung angezeigt wurde.

Bei dem Aufbau des LFA (siehe Tabelle 13) zeigte die Kombination aus AK gegen P3 als Detektions-AK in Kombination mit AK gegen P1 als Fänger-AK eine deutliche Ausbildung der Testlinie bei allen getesteten Salmonellen der Unterart enterica (auch Gruppe I genannt), sowie kein Signal bei den getesteten Nicht-Zielkeimen. In der Voranreicherung mit der Salmonellensubspecies *arizonae* (auch Gruppe III genannt) konnte ebenfalls kein SipC nachgewiesen werden. (Versuche 2, 3, 7, 9, 10 und 12).

Eine bildliche Darstellung ausgewählter Testergebnisse findet sich im Anschluss an die Tabelle 13 in den Abbildungen 18 bis 20. Für die Illustration wurde jeweils der Teststreifen ausgewählt, der aufgrund der geringeren Hintergrundfärbung den stärksten Kontrast lieferte, um auch mit digitalen Medien das visuell wahrnehmbare Bild bestmöglich wiederzugeben. Die Fotografien aller Tests können dem Anhang entnommen werden.

Abbildung 18 gibt den funktionsfähigen Testaufbau mit mAK P1 als Fänger und mAK P3 als Detektor wieder. In den folgenden Abbildung 19 und 20 sind exemplarisch falsch-negative und falsch-positive Ergebnisse dargestellt.

Tabelle 13: Übersicht der Ergebnisse der LFA mit mAK gegen P1, P2, P3 und gesamt SipC

Ver- such	Testlinie	Detektor (AK-Gold- Komplex, 30 nm, OD 50)	<i>Salmonella</i> <i>enterica</i> ser. <i>Gallinarum</i>	<i>Salmonella</i> <i>enterica</i> ser. <i>Choleraesui</i> <i>s</i>	<i>Salmonella</i> <i>enterica</i> ser. <i>Typhimuriu</i> <i>m</i>	<i>Salmonella</i> <i>enterica</i> ser. <i>Senftenberg</i>	<i>Salmonella</i> <i>enterica</i> ser. <i>Enteritidis</i>	<i>Salmonella</i> <i>enterica</i> ser. <i>Heidelberg</i>	<i>Salmonella</i> <i>arizonae</i> ser. 51:Z ₄ ,Z ₂₃ :-	<i>Escherichia</i> <i>coli</i>	<i>Citrobacter</i> <i>freundii</i>	<i>Shigella</i> <i>sonnei</i>	<i>Yersinia</i> <i>pseudo-</i> <i>tuberculosis</i>	<i>Staphylococ</i> <i>cus</i> <i>aureus</i>
1	mAK P1	mAK P2	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +
2	mAK P1	mAK P3	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +
3	mAK P1	mAK SipC	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: (+)	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +
4	mAK P2	mAK P1	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +
5	mAK P2	mAK P3	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: (+)
6	mAK P2	mAK SipC	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: (+)	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +
7	mAK P3	mAK P1	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +
8	mAK P3	mAK P2	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +
9	mAK P3	mAK SipC	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: - C: +	T: (+) C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +
10	mAK SipC	mAK P1	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: (+) C: +	T: - C: +	T: - C: +
11	mAK SipC	mAK P2	T: + C: (+)	T: + C: (+)	T: + C: (+)	T: + C: (+)	T: + C: (+)	T: + C: (+)	T: + C: (+)	T: + C: (+)	T: + C: (+)	T: + C: (+)	T: + C: (+)	T: + C: (+)
12	mAK SipC	mAK P3	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: + C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +	T: - C: +

T = Testlinie, C = Kontrolllinie, + = positives Testergebnis, (+) = schwach positives Testergebnis, - = negatives Testergebnis

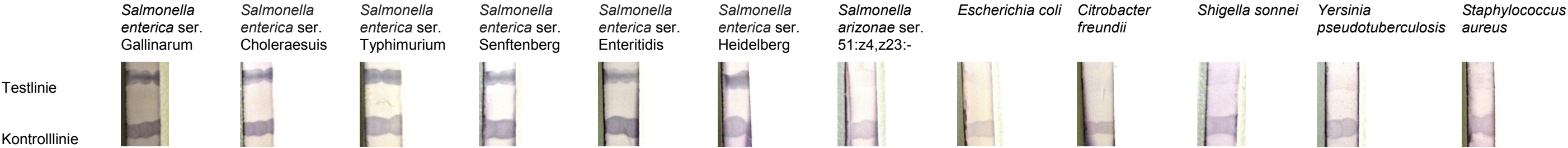


Abbildung 18: Versuch 2; LFA-Aufbau zum Nachweis von SipC mit mAK gegen P1 (Testlinie), AK-Gold-Komplex (mAK gegen P3), Anti-Maus-IgG (Kontrolllinie); Proben: Voranreicherungsbouillon unterschiedlicher Bakterien; deutliche Banden bei den Salmonellen-Teststämmen (außer *Salmonella* ser. *arizonae*), kein Nachweis bei den Nicht-Zielkeimen

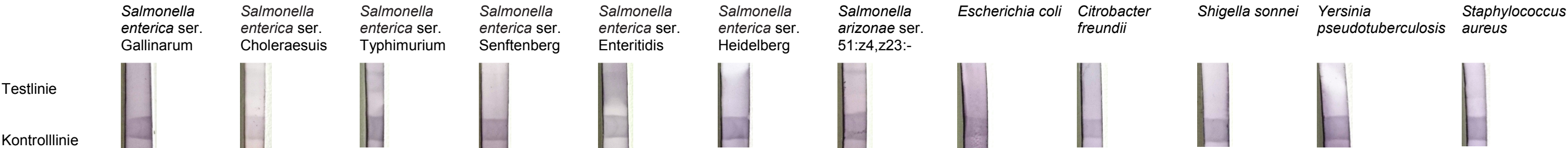


Abbildung 19: Versuch 4; LFA-Aufbau zum Nachweis von SipC mit mAK gegen P2 (Testlinie), AK-Gold-Komplex (mAK gegen P1), Anti-Maus-IgG (Kontrolllinie); Proben: Voranreicherungsbouillon unterschiedlicher Bakterien; falsch-negative Ergebnisse bei den Salmonellen-Teststämmen und deutlich zu erkennende Hintergrundfärbung

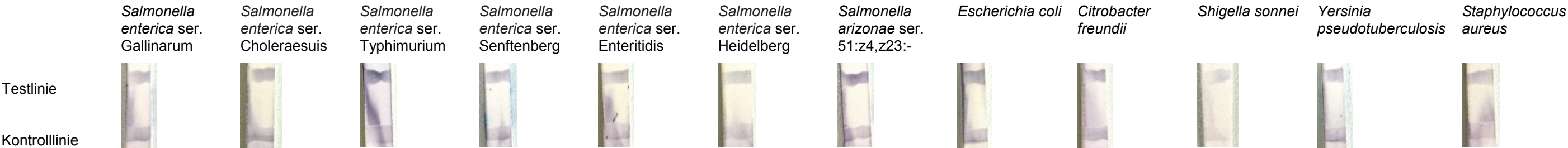


Abbildung 20: Versuch 8; LFA-Aufbau zum Nachweis von SipC mit mAK gegen P3 (Testlinie), AK-Gold-Komplex (mAK gegen P2), Anti-Maus-IgG (Kontrolllinie); Proben: Voranreicherungsbouillon unterschiedlicher Bakterien; falsch-positive Ergebnisse bei den Nicht-Zielkeimen

5 Diskussion

5.1 *Quantität und Qualität der polyklonalen Antikörper*

Eine grundlegende Bedingung zur Entwicklung des in vorliegender Arbeit vorgestellten LFA zur Detektion des SipC Proteins ist das Vorhandensein spezifischer Antikörper. Zum Testzeitpunkt waren Antikörper gegen das SipC nicht kommerziell erhältlich, ebenso verhielt es sich mit dem Zielantigen. Die gewünschten Antikörper mussten selbst hergestellt werden. Dabei wurde für die Immunisierung auf synthetische Peptide zurückgegriffen. Dadurch ergeben sich mehr Möglichkeiten für den Aufbau eines funktionstüchtigen immunologischen Detektionssystems durch Kombination der einzelnen Antikörper, zudem wurden so patentrechtliche Überschneidungen vermieden (siehe Kapitel 1). Zum Aufbau des angestrebten Testsystems eines nicht kompetitiven LFA werden mindestens zwei verschiedene AK benötigt, die gegen das Zielantigen gerichtet sind – ein an die Membran gebundener Fänger-AK und ein markierter Detektions-AK.

Mit der Peptidsynthese können Antikörper schnell, weitestgehend automatisiert und in ausreichenden Mengen hergestellt werden (LUTTMANN et al., 2014). So wurde bereits eine große Anzahl von peptidinduzierten Antikörpern gegen die unterschiedlichsten Proteine entwickelt (JACKSON et al., 1999; CHERSI et al., 1997). In vorliegender Arbeit wurden nach strukturanalytischer Betrachtung des SipC Proteins fünf verschiedene, hochantigene Domänen ausgewählt und in Form von Peptiden synthetisiert, womit die Chance auf mindestens einen reaktiven Antikörper aus der Immunisierung sehr hoch war. Mit nur einem AK hätte man auf ein kompetitives Testformat zurückgreifen können.

Da synthetische Peptide für die Produktion der Antikörper genutzt wurden, bot sich auch nachträglich die Möglichkeit, die generierten Antikörper mittels Affinitätschromatographie aufzureinigen, indem die Peptide über SH-Gruppen an die jeweilige Matrix gebunden werden konnten. Trotz dieses Vorteils konnten nur wenige spezifische AK aus den polyklonalen Seren gewonnen werden. Der Gesamteiweißgehalt in Kaninchenserum liegt bei 49...74 g l⁻¹ (Normwerte für Kaninchen, <http://www.laboklin.com>, abgerufen am 02.08.2015), die IgG nehmen daran zu 11...18 % Anteil. Daraus ergibt sich durchschnittlich ein therotischer Gewinn an IgG von 8 mg ml⁻¹, was durch Unter-

suchungen von HEMPEL (2002) bestätigt wurde. Die eigenen IgG-Aufreinigungen (siehe Kapitel 4.1.1) ergaben maximal $2,8 \text{ mg ml}^{-1}$.

Aufgrund des bereits geringen IgG Gehaltes liegt dementsprechend auch die absolute Menge an spezifischen AK nach Aufreinigung mittel Sulfo[®] Link unter der erwarteten Größenordnung. Dass die gewählte Aufreinigungsmethode jedoch geeignet war, zeigte sich an der erhaltenen relativen Menge an spezifischen AK. Diese entspricht mit ca. 0,05 % den Literaturwerten von 0,2...2 % spezifischen AK an Gesamtantikörpern (BROWN, 2009).

Grundsätzlich ließ sich die theoretische Voraussage zur Immunreaktion der einzelnen Peptidsequenzen durch die Biosynthan GmbH auf die Praxis übertragen. Vom Antiserum des mit Peptid 1 immunisierten Tieres konnte am meisten IgG und dementsprechend auch spezifisches IgG aufgereinigt werden. Das Antiserum des mit dem Peptid 5 immunisierten Tieres lieferte am wenigsten spezifisches IgG.

Für den Einsatz im LFA werden AK-Konzentrationen von $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ benötigt. Es war somit bereits nach der Aufreinigung abzusehen, dass die pAK allein aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Menge nicht für die Verwendung im LFA geeignet waren. Ein Aufkonzentrieren, z.B. über Filter, kam daher für einen kompletten Versuchsaufbau ebenfalls nicht in Betracht, da es zwangsweise mit einer Reduzierung der Antikörpermenge einhergeht.

Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der AK-Ausbeute wäre die Anpassung des Immunisierungsprotokolls, allerdings wäre das mit dem Einsatz weiterer Versuchstiere verbunden. Zudem ist ein hoher Antikörpertiter keine zwingende Voraussetzung für die Brauchbarkeit der gewonnenen pAK. Daher wurde das Augenmerk zunächst darauf gelegt, die AK auf einen möglichen Einsatz in immunochemischen Tests zu prüfen, indem ihre spezifische Bindung zum Zielantigen untersucht wurde.

Die Spezifität der gegen die Peptide gerichteten AK sollte mit der von monoklonalen AK vergleichbar sein, da aufgrund der geringen Größe des Moleküls jeweils AK gegen ein einzelnes Epitop des SipC-Proteins gebildet werden. Im Dot Blot konnte die spezifische Bindung der Anti-Peptid-AK an die komplementären Peptide auch eindeutig nachgewiesen werden, im Western Blot gelang das nur zum P1. Die Ursache wird darin gesehen, dass die Dot Blot Methode sensitiver als das Western Blot Verfahren ist (KUCZIUS, 2007). Im Western Blot (siehe Abbildung 16, Kapitel 4.1.2) sind

zwei Proteinbanden zu erkennen, was darauf hindeutet, dass die Proteine des pAK P1 in verschiedenen Formen vorliegen, die aufgrund ihrer Auftrennung im Gel im anschließenden Western Blot unterschieden werden können. Diese Differenzierung findet im Dot Blot nicht statt, hier werden die beiden Proteinformen akkumuliert als ein Spot sichtbar. Sollten die pAK P2 bis pAK P5 ebenfalls in unterschiedlichen Proteinformen vorliegen, ist es möglich, dass aufgrund der geringeren AK-Konzentration der aufgereinigten Seren von pAK P2 bis pAK P5 gegenüber pAK P1 eine Detektion im Western Blot nicht möglich war.

Dass die zu geringe AK-Konzentration die Ursache für die fehlenden Banden im Western Blot sein könnten, bestätigte sich im durchgeführten ELISA (Kapitel 4.1.3). Es zeigte sich nur bei zwei der getesteten pAK eine eindeutig positive Reaktion bei *Salmonella* ser. Typhimurium – beim pAK gegen Peptid 3 in der 1:10 Verdünnung sowie in der 1:50 Verdünnung und beim pAK gegen Peptid 4 in der 1:10 Verdünnung. Kreuzreaktionen zu *Escherichia coli* konnten nicht festgestellt werden, allerdings war auch keine Bindung an den Überstand von *Salmonella* ser. Choleraesuis zu erkennen.

Im Dot Blot des AK-Pools konnte diese Beobachtung ebenfalls gemacht werden. Eine spezifische AK-Reaktion war bei den Salmonellen zu erkennen, wobei die Probe aus *Salmonella* ser. Typhimurium auch hier anscheinend mehr SipC als *Salmonella* ser. Choleraesuis beinhaltete. Reaktionen waren bei der Serovar Choleraesuis bei einer Antigen-Verdünnung von 1:10 nur schwach bzw. bei 1:50 sehr schwach zu erkennen. Bei Serovar Typhimurium hingegen erfolgte eine eindeutige Reaktion bei einer Verdünnung von 1:10 und 1:50, bei der 500-fachen Verdünnung immer noch eine schwach sichtbare Bindung. Keine AK-Reaktion erfolgte bei *Citrobacter freundii* und *Escherichia coli*.

Zu den Versuchszeitpunkten konnte nur vermutet werden, dass *Salmonella* ser. Choleraesuis weniger SipC ausschüttet als *Salmonella* ser. Typhimurium. Diese These wurde aus Erfahrung bei der Kultivierung von *Salmonella* mittels Standardmethode aufgestellt, wonach sich die Serovar Choleraesuis deutlich schwerer kultivieren lässt als Typhimurium. Da das SipC-Protein zum damaligen Zeitpunkt nicht kommerziell erhältlich war, musste jedoch auf Kulturüberstände von *Salmonella* ser. Typhimurium und *Salmonella* ser. Choleraesuis zurückgegriffen werden. Die späteren,

in dieser Arbeit dargestellten Versuche zum Nachweis der Sezernierung von SipC in Voranreicherungsmedien bestätigten die Richtigkeit der Vermutung.

Die Ergebnisse des ELISA zeigten damit ebenso wie der Western Blot, dass die polyklonalen Anti-Peptid-Antikörper P2 bis P5 in zu geringer Konzentration vorlagen. Selbst eine AK-Verdünnung von 1:10 (üblich im ELISA ist eine Verdünnung von 1:1000) war für den ELISA ungeeignet.

Da für einen LFA noch deutlich höhere AK-Konzentrationen eingesetzt werden, erwies es sich als notwendig, mAK produzieren zu lassen. Darüberhinaus kann so eine gleichbleibende Qualität der AK sichergestellt werden. Dazu wurden die Sequenzen der Peptide 1 bis 3 ausgewählt, obwohl die Spezifität des pAK P5 im Dot Blot bis zur stärksten Verdünnung (1:1000) nachweisbar, die der pAK P2 nur bis zu einer Verdünnung von 1:50. Ebenso konnte bei den pAK P4 im ELISA eine positive Reaktion verzeichnet werden, obwohl der Dot Blot mit diesem AK nur in der niedrigsten Verdünnungsstufe deutliche Reaktionen zeigte. Den Ausschlag zur Auswahl der Peptidsequenzen 1 bis 3 gaben letztendlich die Erfahrung aus der AK-Produktion nach Immunisierung der Kaninchen und die Berechnung der Biosyntan GmbH. Danach sank die immunogene Wirkung von P1 zu P5, weshalb die Arbeit mit den ersten drei Peptiden den größten Erfolg versprach. Die Konzentrationen der durch den Hersteller aufgereinigten monoklonalen AK-Lösungen, die letztendlich für den LFA eingesetzt wurden, beliefen sich auf $5,8 \text{ mg ml}^{-1}$ mAK P1, $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$ mAK P2 und 2 mg ml^{-1} mAK P3, erreichten also ca. das 100-fache der Konzentration an spezifischem pAK.

5.2 ELISA zum Nachweis der Sezernierung von SipC in Voranreicherungsmedien

Neben der Affinität der AK zum Antigen spielt natürlich auch die Quantität des Zielantigens eine entscheidende Rolle. Ohne eine ausreichende Menge an Antigen kommt es nicht oder nur zu einer schwachen Ausbildung der Testlinie in einem LFA. Daher wurde parallel untersucht, welches Medium sich für die Anzucht von Salmonellen im Hinblick auf eine optimale Sezernierung des Zielantigens SipC am besten eignet.

In Überständen aus gepuffertem Peptonwasser und Nährbouillon konnte SipC mit höchster Konzentration nachgewiesen werden (Tabelle 12). Diese nährstoffreichen

Medien fördern ein intensives Salmonellenwachstum, zusätzlich wird ggf. durch Puffersubstanzen (z.B. Phosphat in GPW) bakterienschädigenden pH-Schwankungen vorgebeugt. SipC war aus diesen Medien häufig bereits nach 8...10 h nachweisbar.

Nachteil dieser Medien war, dass sich Kreuzreaktionen zu *Escherichia coli* zeigten. Entweder führte der verwendete pAK zu unspezifischen Bindungen an im Überstand enthaltenen Proteinen oder *Escherichia coli* sezerniert ein SipC-ähnliches Protein in das umgebende Milieu. Homologien wurden jedoch bisher nur zu den Effektorproteinen der gramnegativen Bakterien *Shigella* ssp. (IpaC) und *Yersinia* ssp. (YopQ) beschrieben (SUÁREZ, RÜSSMANN, 1998; GALÁN, 1996). Eigene Recherchen mittels Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) zeigten darüber hinaus jedoch Ähnlichkeiten zu einem Invasionsprotein (31,8 %) aus *Escherichia coli*, welches nach ISBERG, VOORHIS und FALKOW (1987) auf der Zellmembran lokalisiert ist, sowie einem nicht näher charakterisierten Protein (37,7 %) aus *Escherichia coli*.

Bis auf die Versuchsreihe mit *Escherichia coli* stiegen die Extinktionen der anderen Nicht-Zielkeime über die Versuchsdauer von 20 h nicht weiter an. Eine mögliche Strategie zur Vermeidung von Kreuzreaktionen könnte daher in der Voranreicherung mit Caso-Bouillon liegen. In diesem Medium konnte ein deutlicher SipC-Nachweis (mindestens dreifach über Blank) zwar überwiegend erst zum Ende des Testzeitraumes erbracht werden, allerdings traten auch kaum Kreuzreaktivität zu den Nicht-Zielkeimen auf. Weitere Tests könnten die Voranreicherungszeiten zwischen 10...20 h in den Fokus nehmen, da in diesem Zeitraum der Übergang von „kein Nachweis“ zu „sehr starkem Nachweis“ liegt. Dabei stellt sich allerdings die Frage nach der Praxistauglichkeit im Laboralltag. Sofern die Labormitarbeiter nicht in zwei oder drei Schichten arbeiten, erübrigen sich diese Zwischenzeiten. Der 20-Stunden-Rhythmus ist aufgrund der etablierten mikrobiologischen Standardmethode zum Nachweis von Salmonellen üblich. Die Voranreicherung erfolgt bei diesem Verfahren in einem Zeitraum von $18 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

Die Voranreicherungsmedien ohne Nährstoffe lieferten selbst nach 20 h kein oder nur gering nachweisbares SipC, ebenso das Medium mit Magermilch. Aus der Arbeit von D'AUOST (1981) geht hervor, dass die Dauer der Inkubation für die Isolierung von Salmonellen eine größere Bedeutung besass als das eingesetzte Voranreicherungsmedium. Eventuell würde also eine längere Bebrütung doch noch zur vermehrten

Ausschüttung von SipC führen, was jedoch für die Entwicklung eines möglichst schnellen Testsystems nicht relevant ist.

Durch die Versuche konnten die Beobachtungen von SRIKANTH et al. (2011) und DAEFLER (1999) bestätigt werden, dass die Sekretion und Translokation von *Salmonella* unabhängig voneinander auftreten kann. Der eigene Versuch zeigt überdies, dass *Salmonella* selbst in Abwesenheit von Wirtszellen das SipC-Protein ins umgebende Medium sezerniert. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass eine auf die Voranreicherung folgende selektive Anreicherung, wie bei vielen alternativen Salmonellen-Nachweisverfahren üblich, nicht notwendig ist.

5.3 LFA zum Nachweis von Salmonellen aus Kulturüberständen

Bei dem Aufbau des LFA zeigte die Kombination aus AK gegen P3 als Detektions-AK sowohl in Kombination mit AK gegen P1 als auch gegen das gesamt-SipC als Fänger-AK eine deutliche Ausbildung der Testlinie bei allen getesteten Salmonellen der Unterart *enterica*, sowie kein Signal bei den getesteten Nicht-Zielkeimen. In der Voranreicherung mit der Salmonellensubspecies *arizonae* konnte ebenfalls kein SipC nachgewiesen werden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Protein tatsächlich nicht sezerniert wurde. Salmonellenspecies der Unterart *enterica* sind bezüglich ihrer Effektorproteine und deren Sekretion recht gut erforscht, wohingegen es zur Gruppe IIIa nur wenige Arbeiten gibt. Salmonellen der Gruppe IIIa kommen vornehmlich in kaltblütigen und wechselwarmen Vertebraten vor und führen nur sporadisch zu Infektionen bei Säugern und Vögeln. KATRIIBE et al. (2007) fanden eine Erklärungsmöglichkeit, *Salmonella arizonae* bindet im Mausmodell zwar an die Darmepithelzellen, ist jedoch unfähig, systemische Infektionen, an denen SipC beteiligt ist, hervorzurufen. Obwohl die Wissenschaftler SipC mit einer strukturellen Ähnlichkeit von 94 % auch in der Gruppe IIIa nachweisen konnten, wurde das Protein mittels korrespondierender AK nur im Zelllysate detektiert. Unter In-vitro-Bedingungen, die die Sekretion von SipC der Gruppe I erlaubte, blieb die Sekretion des SipC aus den getesteten *Salmonella arizonae* Stämme aus. Es ist daher möglich, dass die Maßgabe, alle Salmonellenserovaren zuverlässig zu detektieren, mit einer einfachen Voranreicherung nicht eingehalten werden kann.

Aus den Versuchen zur Voranreicherung zeichnete sich dieses Phänomen noch nicht ab. SipC konnte in Caso-Bouillon nach 20 Stunden eindeutig nachgewiesen werden. Die Ursache für die divergierenden Ergebnisse liegt vermutlich in der Probenvorbehandlung begründet. Aufgrund der Arbeit mit Pathogenen wurden die Kulturüberstände für den ELISA nicht direkt aufgetragen. Vor der Verwendung wurden die Überstände 30 min abzentrifugiert (3500 g). Die auf die Zellen wirkende Zentrifugalkraft zerstört intakte Strukturen, so dass das nachgewiesene SipC anscheinend aus dem nunmehr freiliegenden Zytoplasma stammte, was der Forschungsarbeit von KATRIIBE et al. (2007) entspricht.

Um auch die Serovaren der Salmonellen-Gruppe IIIa mit dem LFA zu detektieren, ist demzufolge vor dem Auftrag der Probe ein Aufbrechen der Zellstrukturen, z.B. über Zentrifugation und Lyse, notwendig. Man könnte dem Anwender des LFA auch die Wahl lassen, indem man in der Bedienungsanleitung des Streifentests auf die entdeckte Einschränkung eingeht und die Probenvorbereitung entsprechend mit zwei Varianten angibt. Entscheidet man sich gegen den zusätzlichen Schritt des Aufbrechens der Zellstrukturen, können 99 der 2557 bekannten Serovaren nicht detektiert werden. In den meisten Anwendungsfällen des LFA werden diese Vertreter der Salmonellen keine oder nur eine untergeordnete Relevanz haben, denn neben der geringen Anzahl an Serovaren ist das natürliche Habitat dieser Salmonellen der Darmtrakt wechselwarmer Tiere (siehe Kapitel 2.1.3). Die Möglichkeit der geschilderten Probenvorbereitung muss in jedem Fall durch entsprechende Versuchsreihen noch abgesichert werden. Zusätzlich sollten in den Versuch weitere *enterica*-Subspecies (*salamae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica*) sowie *Salmonella bongori* einbezogen werden. Vertreter dieser Salmonellengruppen wurden in vorliegender Arbeit nicht eingesetzt, das Augenmerk lag zunächst auf epidemiologisch bedeutsamen Serovaren.

Je nach gewählter AK-Kombination ergaben sich bei den übrigen Versuchen Schwierigkeiten bei der Detektion. Aufgrund der divergierenden Testsignale und der Tatsache, dass für alle Testreihen dasselbe Probenmaterial mit gleicher Konzentration eingesetzt wurde, schließen sich die meisten in der Literatur beschriebenen Interferenzen jedoch aus.

So wird z.B. von JONES (1999a) geschildert, dass falsch negative Testergebnisse aus einem möglichen Auswaschen der Testlinie resultieren können. Dafür werden zwei mögliche Ursachen angeführt, zum Einen ein Auswaschen durch ein Blocken der

Membran – was in vorliegendem Fall nicht durchgeführt wurde – und zum Anderen durch die Probenflüssigkeit selbst während des Flusses durch die Membran. Dazu müsste jedoch eine mangelnde Bindung der AK an die Membran vorliegen. Üblicherweise ist die Bindung zwischen AK und Membran auf Grundlage von hydrophoben und elektrostatischen Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen jedoch sehr stabil. Zudem wird gerade Nitrocellulose eine hohe Bindungskapazität zugesprochen (HOCHLEITNER, 2012 ; JONES, 1999a, b). Ein vollständiges Auswaschen ist daher unwahrscheinlich. Zudem liegen ausreichend positive Testsignale bei gleichem Verfahren des Auftrags der Testlinie vor. Gegen eine Ausschwämmung spricht auch, dass die Kontrolllinie bei allen Testdurchläufen mit Ausnahme des Versuches 11, bei dem die Ausbildung der Kontrolllinie nur als sehr schwach wahrgenommen wurde, erschien. Allerdings muss eingeräumt werden, dass das nach TISONE und O'FARRELL (2009) wichtige Trocknen der Membran nach Applikation von Test- und Kontrolllinien nicht ausreichend gewesen sein könnte. Die Bindung des Proteins an die Nitrocellulosemembran sollte nach retrospektiver Recherche bei dem Membran-Hersteller MDI stärker werden, je trockener die Membran ist. Die maximale Bindung wird bei einer Temperatur von 20...30 °C und einer relativen Luftfeuchte von 50...60 % nach 3...5 d erreicht. In den bisherigen Versuchen wurde die Membran hingegen ca. 2 h bei 37 °C getrocknet. Um mehr diesbezügliche Sicherheit in das Testsystem zu bringen, müssen weitere Versuche mit einer längeren Trocknungsphase der Membran nach Auftrag der AK durchgeführt werden.

Die Produktion der mAK erfolgte in Zusammenarbeit mit einem routinierten Hersteller, zudem wurden die Antikörperqualitäten im Vorfeld getestet und nur die AK mit der höchsten Affinität für den LFA-Aufbau verwendet. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass Interferenzen durch die molekularbiologische Struktur des Analyten hervorgerufen wurden. Für das vorliegende Testformat eines Sandwiches muss das Antigen zwei Epitope besitzen, die strukturell soweit voneinander entfernt liegen, dass beide Antikörper das Antigen binden können, ohne sich dabei gegenseitig sterisch zu behindern. Eventuell blockierten sich die AK-Kombinationen mAK P1 mit mAK P2 in Versuch 1 und 4. Es besteht die Möglichkeit, dass die Epitope zu dicht beieinander liegen. So kann der Detektor-AK zwar das SipC aus der Probe binden, dieser Antikörper-Antigen-Komplex jedoch vom Fänger-AK, woraus falsch-negative Ergebnisse aus den Salmonellenproben resultieren. Die Peptide P1 und P2 werden jedoch in der

Primärstruktur durch 332 Aminosäuren getrennt, wohingegen die Peptide der AK-Kombination, die richtige Testergebnisse lieferte (mAK P1 mit mAK P3), mit nur 5 Aminosäuren Abstand deutlich dichter beieinander liegen. Da die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur des SipC-Proteins nicht bekannt ist und das SipC Protein bisher nicht kristallisiert und bezüglich seiner Raumstruktur vollständig analysiert wurde, ist eine Aussage zur Zugänglichkeit der Epitope im gefalteten, nativen Protein nicht möglich. Zudem ist nicht bekannt, in welcher Orientierung die AK binden. Durch SCHERER, COOPER und MILLER (2000) wurden für die Aminosäuren 345 bis 407 des SipC-Proteins, in dem Bereich auch die Sequenzen für P1 und P3 liegen, mittels PROSITE Datenbank alpha-Helix-Strukturen vorausgesagt. Die spiralförmige Anordnung könnte wiederum dazu führen, dass diese Aminosäuresequenzen, obwohl sie in der Primärstruktur durch nur wenige Aminosäuren getrennt werden, weit genug für die Bindung an die AK P1 und P3 auseinander liegen. Eine abschließende Beurteilung dieser Frage ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich.

Eine notwendige Voraussetzung für die Bindung der Anti-Peptid-AK an das native Protein ist weiterhin, einen Proteinabschnitt zu wählen, der sich an der Oberfläche des nativen Proteins befindet. Da nur Antikörper exponierter Teilstücke die Möglichkeit zur Reaktion mit dem intakten Makromolekül haben, sollten die Peptide vorzugsweise aus dem Oberflächenbereich des natürlichen Proteins gewählt werden. Die räumliche Struktur liegt jedoch nicht vor, so dass nur auf mathematische Modelle zurückgegriffen werden konnte (vgl. Kapitel 3.2.1). Die Fähigkeit der Anti-Peptid-AK, sowohl an die komplementären Peptide als auch an das native SipC zu binden, konnte durch unterschiedliche immunologische Methoden im Vorfeld nachgewiesen werden (Ergebnisse der mAK in dieser Arbeit nicht dargestellt). Es ist daher nicht davon auszugehen, dass die Lokalisation der ausgewählten Peptidsequenzen die Ursache für die falsch negativen Ergebnisse ist.

Eine mögliche Ursache für das Auftreten falsch negativer Ergebnisse könnte auch in der grundsätzlichen Verwendung von mAK liegen. Der eigentliche Vorteil von mAK, die Monospezifität durch Bindung an nur ein einzelnes Epitop, könnte sich im vorliegenden Fall als nachteilig erweisen. Da die Zahl der potentiellen Bindungsstellen pro Antigen gegenüber pAK reduziert ist, könnten nur unzureichend wenige AK-Moleküle in dem Assay binden, womit die Grenze der Nachweisbarkeit nicht erreicht wird. Dies könnte z.B. durch den Einsatz eines AK-Gemisches aus verschiedenen mAK opti-

miert werden. Da jedoch eine AK-Kombination des Sandwiches bereits erfolgreich war, wird es als sinnvoll angesehen, die Assayoptimierung auf Grundlage dieser mAK vorzunehmen.

RAUCH et al. (2005) beschreiben Kreuzreaktionen im Zusammenhang mit dem Einsatz von AK, die gegen ein Target mit konservierten Aminosäuresequenzen eines Proteins gerichtet sind, dessen Sequenzmotive auch bei anderen Proteinen vorkommen. Ein Sequenzvergleich mittels BLAST zeigte bezüglich P1 eine Ähnlichkeit zu zwei nicht näher hinsichtlich ihrer Funktionen beschriebenen Proteinen aus *Escherichia coli* in Höhe von 73,3 %. Es handelt sich um die Proteine, die auch während der Prüfung des gesamten SipC-Proteins ausfindig gemacht wurden. Zu P2 konnten keine Übereinstimmungen mit den im Versuch gewählten Teststämmen gefunden werden, wohingegen bei P3 wiederum Homologien zu bereits bei P1 festgestellten Proteinen aus *Escherichia coli* vorkommen (93,3 %). Die Ähnlichkeiten in der Sequenz der Peptide als auch, wie weiter oben beschrieben, des SipC-Proteins mit Invasionsproteinen der *Shigella* ssp. könnte ein Grund für das falsch-positive Signal bei *Escherichia coli* in Versuch 9 bzw. bei *Shigella sonnei* in Versuch 10 sein. Allerdings ist die Homologie nicht der ausschlaggebende Faktor für die Kreuzreaktivität. Nach CHERSI et al. (1997) können drei oder vier Aminosäuren, in Schlüsselposition platziert, ausreichen, um Kreuzreaktionen des Antipeptid-AK mit verwandten oder auch nicht verwandten Molekülen hervorzurufen. Diese Fälle sind ausgehend von der Sequenzhomologie zwischen zwei Molekülen nicht immer vorhersagbar. So können ähnliche Peptide AK mit komplett unterschiedlichen Spezifitäten – von hoch kreuzreaktiv bis gar nicht kreuzreaktiv – hervorrufen. Ausschlaggebend ist, wo die Homologie zwischen den Peptiden lokalisiert ist. Liegt sie in der Region des Hauptepitops, so führt dies zu hoher Kreuzreaktivität. Da sowohl exakte Messergebnisse ohne einen Hinweis auf Kreuzreaktionen zu *Escherichia coli* und *Shigella sonnei* erzielt als auch falsch-positive und falsch-negative Testsignale erzeugt wurden, könnte das geschilderte Problem eine Erklärung sein.

Auffällig ist, dass bei allen LFA dieser Versuchsreihe eine unspezifische Hintergrundfärbung der gesamten Membran auftrat. Mögliche Ursache kann fehlende Mobilität der markierten AK in der Membran sein. Das Problem liegt dabei häufig in der Chemie des Conjugate Pads oder der Probenzusammensetzung (MDI, 2015). Im Zuge der Assayoptimierung sollte daher der Einsatz eines separaten Sample und

Conjugate Pads aus unterschiedlichen Materialien berücksichtigt werden. Auch die Verwendung von Probenpuffern, die den pH-Wert im für das Goldkonjugat optimalen Bereich von ca. 7,4 halten, könnte die Hintergrundfärbung verringern. SCHNEIDER et al. (2007) halten auch eine zu hohe Konzentration an goldmarkiertem AK für eine mögliche Ursache der Hintergrundfärbungen. Diskutiert werden von WOOD (1991) unspezifische Effekte, hervorgerufen durch ungebundene Goldpartikel, die in porösen festen Phasen wie Zellulose zurückgehalten werden. KLEWITZ (2005) zeigte in seinen Versuchen, dass eine hohe Konzentration an Goldkonjugat zu unspezifischen Bindungen mit den in der Testlinie immobilisierten AK führte. Dieses Phänomen wird auch von RAUCH et al. (2005) aufgegriffen. Die Autoren beschreiben, dass der goldmarkierte AK an die Fc-Region des Fänger-AK bindet und daraus positive Testergebnisse auch in Abwesenheit des Analyten folgen. Das Bild wird durch das manuelle Mischen des Analyten mit dem markierten AK und Fehlen des Conjugate Pads noch begünstigt und könnte die falsch-positiven Signale in den Versuchen 5, 6 und 11 erklären. Daher sollten ebenso Versuche zur Senkung der Goldkonjugatkonzentration erfolgen. Allerdings setzt dies voraus, dass das damit einhergehende Herabsetzen der Testsensitivität einen Nachweis des Analyten nach wie vor möglich macht.

Eine zu geringe Konzentration an immobilisiertem AK auf den Testlinien wird ebenfalls nicht in Betracht gezogen, da die AK unverdünnt, je nach mAK in einer Konzentrationen von $1,6 \text{ mg ml}^{-1}$ bis $5,8 \text{ mg ml}^{-1}$, aufgegeben wurden und somit reichlich vorlagen. Der Auftrag erfolgte mittels Pipette. Für einen Streifen von ca. 0,5 cm Breite wurden im Durchschnitt 2,5 Pipettenfüllungen verbraucht, womit die Antikörpermenge pro Linie auf mindestens $4 \dots 14,5 \text{ } \mu\text{g}$ geschätzt werden kann. Erfahrungsgemäß ist ein Zehntel dieser Menge in der Praxis ausreichend (BANGS LABORATORIES, 1999).

Grundsätzlich birgt natürlich auch das manuelle Zusammensetzen der einzelnen Komponenten des LFA ein Risiko für falsche Ergebnisse. Nach WONG and HARLEY, (2009) führen Unterschiede in der Überlappung der Bestandteile zu nicht reproduzierbaren Fließeigenschaften. Der Einsatz eines automatischen Klebesystems kann helfen, dieses Problem zu eliminieren.

Auch typische Anwenderfehler müssen in Betracht gezogen werden. Allerdings wurden diese durch gewisse Übung im Vorfeld oder den Versuchsaufbau selbst weitestgehend minimiert. Ein „Überfluten“ der Membran käme z.B. nicht zum Tragen. Dabei

kann durch eine zu große Probenmenge die Flüssigkeit regelrecht über das Conjugate Pad schwappen, ohne an die im Pad gebundenen goldmarkierten Primär-AK zu binden, was zu negativen Testergebnissen führen würde. Da kein Conjugate Pad genutzt wurde, sondern die Probe vor Aufgabe mit diesem AK bereits gemischt wurde, wirkt sich eine zu große Probenmenge nicht aus. Zudem wurde der Teststreifen in eine Kunststoffkassette eingelegt, die durch die trichterförmige Probenaufgabevertiefung auch eine größere Menge Probenflüssigkeit gleichmäßig auf die Membran leitet. Der Auftrag eines unzureichenden Probenvolumens, was dazu führen würde, dass die Lauffront die Testlinie gar nicht erreicht, konnte durch Vorversuche ausgeschlossen und anhand der eigentlich unerwünschten starken Hintergrundfärbung während des Laufes sehr gut kontrolliert werden.

Die Herstellung der LFA, wie das Zusammenkleben der Membran- und Pad-Materialien, das Schneiden der Streifen, das Auftragen von Test- und Kontrolllinien sowie des Konjugates, erfolgte bisher manuell im Labormaßstab. Die Muster-LFA bieten mit der Kombination aus mAK P1 und mAK P3 jedoch eine Grundlage für weiterführende Entwicklungsarbeit. Das neue Verfahren für den Nachweis von SipC wurde patentrechtlich geschützt: DE 11 2011 101 430, EP 2 561 362 und WO/2011/131178.

6 Ausblick

Ziel ist es, den LFA nach Abschluss der noch notwendigen Optimierungsarbeiten und Lagerversuchen gemäß DIN EN ISO 16140:2011 gegenüber dem Referenzverfahren der klassischen Mikrobiologie zu validieren, um den Test letzten Endes dem Markt vorzustellen. Die genannte Norm stellt einen Leitfaden für den Aufbau der Versuchsreihen zur Beweisführung der Funktionsfähigkeit des alternativen Verfahrens dar. Danach sind für die Bestimmung der relativen Genauigkeit, relativen Spezifität und relativen Empfindlichkeit fünf Lebensmittelkategorien auszuwählen. In jeder Lebensmittelkategorie werden drei Lebensmitteltypen ausgesucht, von denen je 20 Untersuchungsteilproben mit dem alternativen und mit dem Referenzverfahren gemessen werden (= 600 Untersuchungen). Zur Bestimmung der relativen Nachweisgrenze wird aus jeder der fünf gewählten Lebensmittelkategorien ein Lebensmittel bestimmt. Zudem werden fünf unterschiedliche Zielkeime und drei Konzentrationsstufen der Zielkeime festgelegt, wobei die Stufe 1 die Negativkontrolle und die Stufe 2 die theoretische Nachweisgrenze des Testsystems darstellt. Die Stufe 3 ist die Stufe gerade oberhalb der theoretischen Nachweisgrenze. Je Lebensmittel und Konzentrationsstufe werden 6 Mehrfachuntersuchungen mit dem alternativen und mit dem Referenzverfahren gefordert (= 900 Messungen). Zur Festlegung der Inklusivität (Maß für die spezifische Erfassung) und Exklusivität (Maß für die Ausschlusssicherheit) werden 30 Reinkulturen von Mikroorganismen als Zielkeime und 30 Reinkulturen von Mikroorganismen als Nicht-Zielkeime eingesetzt. Jede Reinkultur wird mit dem alternativen und mit dem Referenzverfahren gemessen (= 120 Messungen).

Bedingt durch die große Anzahl an Versuchen ist eine manuelle LFA-Herstellung nicht mehr realisierbar. Deshalb müssen für die weitere Testoptimierung und -validierung Möglichkeiten zur maschinellen Testfertigung erschlossen werden.

7 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung eines Lateral Flow Assay zur Erkennung einer Salmonelleninfektion bzw. Salmonellenkontamination. Um möglichst alle Salmonellen-Serovaren nachzuweisen, musste sich das Testsystem auf eine Eigenschaft von Salmonellen stützen, die allen Serovaren gemein ist. Salmonellen geben unter In-vitro-Kulturbedingungen unterschiedliche Proteine in das umgebende Medium ab. Eines dieser Proteine ist das SipC-Protein. Die Nukleotidsequenz des SipC-Gens ist bekannt und steht über Gen-Datenbanken zur Verfügung.

Die Arbeit stützt sich auf die Generierung von Antikörpern gegen synthetisch hergestellte Peptide des SipC-Proteins. Hierzu wurden nach strukturanalytischer Betrachtung der Aminosäuresequenz des SipC-Proteins potenziell immunogene Teilstücke von 15 bis 17 Aminosäuren ausgewählt:

- Peptid 1: Der Proteinabschnitt 363-378
mit der Sequenz VASTASDEARESSRKS,
- Peptid 2: Der Proteinabschnitt 15-30
mit der Sequenz NNHSVENSSQTASQSV,
- Peptid 3: Der Proteinabschnitt 343-357
mit der Sequenz GQYAATQERSEQQIS,
- Peptid 4: Der Proteinabschnitt 276-289
mit der Sequenz LGIKDSNKQISPEH und
- Peptid 5: Der Proteinabschnitt 246-260
mit der Sequenz LNMKKTGTDATKNLN.

Nach Synthese der fünf Peptide und Kopplung an KLH wurden die so erhaltenen Lösungen für die Immunisierung von Kaninchen zur Bildung korrespondierender Antikörper verwendet. Das gewonnene Serum wurde mittels Protein A Säulen und dann über SulfoLink® Affinitätssäulen zu spezifischem Immunglobulin G aufgereinigt. Die Bestätigung der Bindung der gewonnenen polyklonalen AK an die Peptide wurde z.B. mittels Dot Blot geführt, wobei sich herausstellte, dass alle AK an das dazugehörige Peptid binden und keine unspezifischen Bindungen zu den Modellallergenen Ovalbumin und Rinderserumalbumin zeigten. Um im Laufe der Entwicklung auf eine ausreichende Antikörperkonzentration in gleichbleibender Qualität zurückgreifen zu können, wurden zusätzlich monoklonale Antikörper produziert. Dabei

wurden drei Peptide (Peptid 1 bis Peptid 3) ausgewählt, von denen die höchste Immunantwort zu erwarten war.

Ein Ziel der Arbeit bestand darin, neben einem zuverlässigen Test zum Nachweis von Salmonellen ein Verfahren zu entwickeln, das einen möglichst frühen Nachweis erlaubt. Dazu wurde erprobt, welches Medium sich für die Anzucht von Salmonellen im Hinblick auf eine optimale Sezernierung von SipC am besten eignet. Es wurden sieben flüssige Standardnährmedien für die Voranreicherung von Salmonellen verwendet. Die gewählten Salmonellen-Teststämme orientierten sich an hygienisch bedeutsamen Serovaren, zudem wurden Nicht-Zielkeime einbezogen, die beim Nachweis mittels klassischem mikrobiologischen Verfahren zu Irritationen führen können oder die ebenfalls das Typ-III Sekretionssystem zur Zellinvasion nutzen.

In Überständen aus gepuffertem Peptonwasser und Nährbouillon konnte SipC am besten nachgewiesen werden, häufig bereits nach 8...10 h. Nachteil dieser Medien war, dass sich Kreuzreaktionen, vor allem zu *Escherichia coli* zeigten. Eine mögliche Strategie zur Vermeidung von Kreuzreaktionen könnte in der Voranreicherung mit Caso-Bouillon liegen. In diesem Medium konnte der SipC-Nachweis zwar bisher überwiegend erst zum Ende des Testzeitraumes erbracht werden, allerdings traten auch kaum Kreuzreaktivitäten zu den anderen getesteten Bakterien auf. Die Voranreicherungsmedien ohne Nährstoffe lieferten selbst nach 20 h kaum nachweisbares SipC, ebenso das Medium mit Magermilch. Weitere Tests sollten die Voranreicherungszeiten zwischen 10 h und 20 h in den Fokus nehmen, da in diesem Zeitraum der Übergang von „geringem Nachweis“ zu „sehr starkem Nachweis“ liegt.

Mit den Versuchen konnte bestätigt werden, dass die Sekretion und Translokation von *Salmonella* unabhängig voneinander auftreten kann und selbst in Abwesenheit von Wirtszellen das SipC-Protein von den getesteten Serovaren mit Ausnahme des Vertreters der Unterart *arizonae* ins umgebende Medium sezerniert wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine auf die Voranreicherung folgende selektive Anreicherung nicht notwendig ist. Die Zeitersparnis bei Anwendung des entwickelten Verfahrens beläuft sich auf mindestens drei Tage gegenüber dem Nachweis von Salmonellen mittels Referenzverfahren der klassischen Mikrobiologie. Im Vergleich mit den meisten bisher am Markt befindlichen alternativen Salmonellen-Nachweisverfahren liegen die Ergebnisse immer noch einen Tag früher vor.

Für den Nachweis des sezernierten SipC-Proteins als Indikator für das Vorhandensein einer Salmonelleninfektion/-kontamination sollte ein Lateral Flow Assay (LFA) genutzt werden. Dieses Testformat wurde festgelegt, damit für den Erregernachweis keine spezielle und kostspielige Laborausstattung notwendig ist. Zudem sind LFAs einfach zu bedienen, lagerstabil und können kostengünstig hergestellt werden. Die begrenzte Fähigkeit von LFAs, quantitative Ergebnisse zu liefern, ist im Hinblick auf die Salmonellenschnelldiagnostik von untergeordneter Bedeutung, da alle Salmonellenserovaren zunächst als potentiell pathogen angesehen werden und eine quantitative Aussage somit überflüssig ist. Eine „Ja/Nein“-Antwort genügt den diagnostischen Ansprüchen.

Beim Aufbau des LFA wurden mAK gegen drei der genannten Peptide (P1 bis P3) sowie gegen das gesamte SipC eingesetzt, wobei sich herausstellte, dass sich die Kombination aus mAK P1 und mAK P3 am besten eignet. Andere Kombinationen führten zu Schwierigkeiten bei der Detektion. Es wird vermutet, dass die Epitope zu dicht beieinander liegen, so dass jeweils nur einer der beiden AK das SipC binden kann. Das Hindernis bei der Beantwortung dieser These besteht darin, dass das SipC-Protein bisher nicht kristallisiert und bezüglich seiner Raumstruktur analysiert wurde. Zudem ist nicht bekannt, in welcher Orientierung die AK binden. Mögliche Erklärungen liegen auch in der manuellen Herstellung und damit zusammenhängenden, nicht optimalen Versuchsbedingungen. Die Ursache für die auftretenden falsch-positiven als auch falsch-negativen Testergebnisse werden auf Störeffekte zurückgeführt und müssen im Zuge der Assayoptimierung weiter untersucht werden.

Die Konstruktion der LFA, wie das Zusammenkleben der Membran- und Pad-Materialien, das Schneiden der Streifen und das Auftragen des Konjugates, erfolgten bisher manuell im Labormaßstab. Die Muster-LFA kommen den Anforderungen in der Praxis jedoch bereits sehr nahe. Um die Leistungsfähigkeit der LFA zu testen, müssen nach Optimierungsarbeiten diverse weitere Versuche durchgeführt werden. Diese richten sich nach der DIN EN ISO 16140:2011, die einen Leitfaden für den Aufbau der Versuchsreihen zur Beweisführung darstellt. Nach Abschluss dieser Arbeiten soll der entwickelte Test dem Markt vorgestellt werden.

8 Summary

This work is involved with the development of a lateral flow assay to recognise a salmonella infection or salmonella contamination. In order to account for as many salmonella serovars as possible, the test system had to be based on a property of salmonella that is common to all serovars. Salmonellas emit different proteins into the surrounding medium in in-vitro culture conditions. One of these proteins is the sipC protein. The nucleotide sequence of sipC genes is known and is available through gene databases.

The work is based on generating antibodies against synthetically manufactured peptides of the sipC protein. For this purpose, a structural-analytical consideration of the amino acid sequence of the sipC protein of potential immunogenic segments of 15 to 17 amino acids were selected:

- Peptide 1: Protein section 363-378
with the sequence VASTASDEARESSRKS,
- Peptide 2: Protein section 15-30
with the sequence NNHSVENSSQTASQSV,
- Peptide 3: Protein section 343-357
with the sequence GQYAATQERSEQQIS,
- Peptide 4: Protein section 276-289
with the sequence LGIKDSNKQISPEH and
- Peptide 5: Protein section 246-260
with the sequence LNMKKTGTDATKNLN.

After synthesis of the five peptides and coupling to the carrier protein KLH, the solutions contained in them were used for the immunisation of rabbits to form corresponding antibodies. The serum that resulted was purified using protein A columns and then SulfoLink[®] affinity columns into a specific immunoglobulin G. Confirmation of the binding of the polyclonal antibodies to the peptides that resulted was made using dot blot, in which it was determined that all antibodies bind to the corresponding peptide and no unspecific binding to the model allergens ovalbumin and bovine serum albumin were demonstrated. As part of being able to develop a sufficient antibody concentration of consistent quality, monoclonal antibodies were also produced.

In doing so, one was limited to the selection of three peptides (peptides 1 to 3) from which the highest immune response was to be expected.

A goal of the work was, alongside developing a reliable test to detect salmonellas, to develop a method that could allow detection as early as possible. To do so, it was investigated which medium was best suited for the growth of salmonella bacteria with regard to an optimal secretion of sipC. Seven liquid standard culture media for the pre-enrichment of salmonellas were used. The selected salmonella test strains were oriented toward serovars that are important to hygiene; in addition, non-target pathogens were included which can lead to irritations when verified with classical microbiological methods or which likewise use the type III secretion system to invade the cell.

In pre-enrichments of buffered peptone water and nutrient broth, sipC is detected the best, frequently even as early as after 8 to 10 hours. The disadvantage of this medium was that it demonstrated cross-reactions, above all with *Escherichia coli*. One possible strategy to prevent cross-reactions could lie in pre-enrichment with caso bouillon. In this medium, sipC demonstration has until now largely only been made at the end of the test timeframe; however, cross-reactivity to the other tested bacteria was barely able to be determined. The pre-enrichment medium without nutrients itself provided hardly any demonstrable sipC after 20 hours, nor did the medium with skim milk. Additional tests are to take the pre-enrichment times between 10 hours and 20 hours into focus, because this time period is where the transition from “low demonstrableness” to “very high demonstrableness” is at.

The tests could confirm that the secretion and translocation of *Salmonella* can occur independently of one another and even in the absence of host cells of the sipC protein from the tested serovars, with the exception of the representatives of the subtype *arizonae* being secreted into the surrounding medium. In addition, it was able to be demonstrated that one of the following selective enrichments is not needed in the pre-enrichment. The time savings when using the method developed is at least three days in comparison to the verification of salmonellas using reference methods of classical microbiology. In comparison with most of the alternative salmonella verification methods on the market up to this point, the results are still ready at least one day earlier.

To demonstrate the secreted sipC protein as an indicator for the presence of a salmonella infection/contamination, a lateral flow assay (LFA) is to be used. The test

format was selected such that no special and costly laboratory equipment is necessary. In addition, LFAs are easy to operate, storage-stable and can be manufactured in a cost-effective manner. The limited capability of LFAs to provide quantitative results is of subordinate importance with regard to the quick diagnostic of salmonella, because all salmonella secretions are initially viewed as a potential pathogen for which a quantitative statement is not necessary, but rather, a yes/no answer is sufficient.

When making the LFA, monoclonal antibodies were used against three of the listed peptides (P1 to P3) and the entire sipC; in doing so, it was determined that the combination of monoclonal antibody P1 and monoclonal antibody P3 are best suited. Other combinations lead to difficulties in detection. It is assumed that the epitopes are too dense, which allows only one of the two monoclonal antibodies to bind to the sipC. The problem in finding a solution to this thesis lies in the fact that the sipC protein until now has not been crystallised and analysed with regard to its physical structure. In addition, it is unknown in what orientation the antibodies bind. Possible explanations also lie in the manual manufacture and the connected, sub-optimal test conditions. The cause of the partially occurring false-positives can be traced back to interference effects and must be examined further as part of assay optimisation.

The design of the LFA, how the membrane and the pad materials stick together, the cutting of the strands and the application of the conjugate has until now been performed manually on a bench-scale model. The sample LFAs, however, come very close to meeting the requirements in the real world. In order to test the LFA performance, following optimisation work, various additional tests must be carried out. These will be oriented toward DIN EN ISO 16140:2011, which is a guideline for the structure of a series of tests to provide evidence. After this work has been finished, the test developed will be presented to the market.

9 Literaturverzeichnis

ANANTHANARAYAN, R.; PANIKER, C.K.Jayaram: *Ananthanarayan and Paniker's Text-book of microbiology*. 8. Auflage. Philadelphia: Universities Press, 2010

ARVANITAKIS, Constantine: Salmonella Infections. In: Magni, M.V. (ed.): *Detection of Bacteria, Viruses, Parasites and Fungi*. Dordrecht: Springer, 2010

AVONDET, Marc-André; HOFMANN, Werner; LANDOLT, Stefan: Lateral Flow Assay. Spietz - Poster Labor Spiez

BAUMGART, J.; BECKER, B.; STEFAN, R. (Hrsg.): *Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln*. Hamburg: Behr's, 1994

BROWN, Michael C.: Antibodies: Key to a Robust Lateral Flow Immunoassay. In: WONG, Raphael C.; TSE, Harley Y. (Hrsg.): *Lateral Flow Immunoassay*. New York: Humana Press, 2009, 59-74

BUHNIA, Arun. K.: *Foodborn Microbial Pathogens. Mechanisms and Pathogenesis*. New York: Springer, 2008

BÖHM, R.: Verhalten ausgewählter Salmonellen in der Umwelt. In: *Dt. tierärztl. Wochenschrift* 100 (1993), 275-278

BOYD, E. F.; WANG, Fu-Sheng; WHITTAM, T. S.; SELANDER, R. K.: Molecular Genetic Relationships of the Salmonellae. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 3, Vol. 62 (1996), 804-808

CARLSON, Steve A.; OMARY, M. Bishr; JONES, Bradley D.: Identification of cytokeratins as accessory mediators of Salmonella entry into eukaryotic cells. In: *Life Sciences*, Vol. 70 (2002), 1415-1426

CHANDLER, J.; GURMIN, T.; ROBINSON, N.: The Place of Gold in Rapid Tests. In: *IVD Technology*, Vol. 6 (2000), 37-49

CHEN, Hui; BERNSTEIN, Barbara W.; BAMBURG, James R.: Regulating actin-filament dynamics in vivo. In: *Trends Biochem. Sci.* 1, Vol. 25 (2000), 19-23

CHERSI, Alberto; DI MODUGNO, Francesca; ROSANO, Laura: Aims and limitations in the use of antipeptide antibodies in molecular biology. In: *Biol Chem.*, Vol. 378 (1997), 635-640

CHUN, Peter: Colloidal Gold and Other Labels for Lateral Flow Immunoassays. In: WONG, Raphael C. ; TSE, Harley Y. (Hrsg.): *Lateral Flow Immunoassay*. New York: Humana Press, 2009, 75-93

COLLAZO, Carmen M.; GALÁN, Jorge E.: The invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium* directs the translocation of Sip proteins into the host cell. In: *Mol. Microbiol.*, Vol. 24 (1997), 747-56

CORK, S. C.: Epidemiology of Pathogens in the Food Supply. In: KRAUSE, D. O.; HENDRICK, St. (Hrsg.): *Zoonotic Pathogens in the Food Chain*. Oxfordshire: CAB International, 2011, 21-58

DAEFLER, Simon: Type III secretion by *Salmonella typhimurium* does not require contact with eukaryotic host. In: *Molecular Microbiology* 1, Vol. 31 (1999); 45-51

D'AOUST, J.-Y.: *Salmonella* In: LABBÉ, Ronald G.; GARCIA, Santos (Hrsg.): *Guide to Foodborne Pathogens*. New York: John Wiley & Sons, 2001

D'AOUST, J.-Y.: Update on Preenrichment and Selective Enrichment Conditions for Detection of *Salmonella* in Foods. In: *Journal of Food Protection* 5, Vol. 44 (1981), 369-374

DEDIÉ, Kurt; BOCKEMÜHL, Jochen; KÜHN, Herrmann; VOLKMER, Klaus-Jörg; WEINKE, Thomas: *Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch – Epidemiologie, Pathologie, Klinik, Diagnostik und Bekämpfung*. Stuttgart: Enke, 1993

DIN EN ISO 16140:2011-12 Mikrobiologie von Lebens- und Futtermitteln - Arbeitsvorschrift für die Validierung alternativer Verfahren (ISO 16140:2003)

DRÄGER, Hans: *Diagnostik der Bakterien der Salmonella-Gruppe – und Ihre Anwendung in der bakteriologischen Fleischuntersuchung*. Berlin: Akademie-Verlag, 1951

EFSA (Hrsg.): *Salmonella. EFSA explains zoonotic diseases*. (2011)

EFSA (Hrsg.): The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. In: *EFSA Journal* 10, Vol. 3 (2012), 442ff

EFSA (Hrsg.): The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. In: *EFSA Journal* 11, Vol. 4 (2013), 250ff

FEHLHABER, K.: *Mikroorganismen*. In: FEHLHABER, K.; JANETSCHKE, P.: *Veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene*. Jena: Gustav Fischer, 1992

FRIES, R.: *Hygiene in der Geflügelfleischgewinnung*. BfR-Symposium Zoonosen und Lebensmittelsicherheit, Berlin, 13.-14.11.2012

GALÁN, Jorge E.: Molecular genetic bases of Salmonella entry in host cells. In: *Molecular Microbiology*, Vol. 20 (2) (1996), 263-271

GALÁN, Jorge E.: SnapShot: effector proteins of type III secretion systems. In: *Cell*, Vol. 130 (2007), 192-193

GALÁN, Jorge E.: Salmonella interactions with host cells: Type III Secretion at Work. In: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, Vol. 17 (2001), 53-86

GALÁN, Jorge E.; COLLMER, A.: Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells, In: *Science*, Vol. 284 (1999), 1322-1328

GALÁN, Jorge E.; WOLF-WATZ, H.: Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. In: *nature* 30, Vol. 444 (2006), 567-573

GAREIS, M: Salmonellen – Ein Überblick. In: *Fleischwirtschaft* 5 (1995), 954-957

GRIMONT, Patrick A.D.; WEILL, Francois-Xavier: *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars*. 9th edition. Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 2007

HAHN, Helmut; KAUFMANN, Stefan H. E.; SCHULZ, Thomas F.; SUERBAUM, Sebastian (Hrsg.): *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Heidelberg: Springer, 2009

HARAGA, Andrea; OHLSON, Maike B.; MILLER, Samuel I.: Salmonella interplay with host cells. In: *Nature Reviews*, Vol. 6 (2008), 53-66

HARLIZIUS, Jürgen : *Salmonellenbekämpfung beim Schwein*. BfR-Symposium Zoonosen und Lebensmittelsicherheit, Berlin, 13.-14.11.2012

HARTUNG, M. : *Ergebnisse der Jahrerhebung 1993 über Salmonellenbefunde*. Ergebnisprotokoll der 47. Arbeitstagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger (ALTS), Berlin, 21.-23.06.1994

HAYWARD, Richard D.; KORONAKIS, Vassilis: Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive Salmonella. In: *EMBO J.*, Vol. 8 (1999), 4926-4934

HEESEMANN, Jürgen; HEINZ, Dirk; RÜSSMANN, Holger; WEHLAND, Jürgen; GOEBEL, Werner; KUHN, Michael: Lektionen aus der Bakterienwelt: Wie Krankheitserreger Wirtszellprozesse ausnutzen. In: *BIOspektrum* Sonderausgabe 9. Jahrgang (2003), 486-489

HEMPEL, Michael: Untersuchungen zum Immunglobulin-G-Status bei neugeborenen Kaninchen und deren Häsinnen unter Berücksichtigung der Verfütterung von Phytotherapeutika. München, Universität, Institut für Tierhygiene, Verhaltenskunde und Tierschutz, Dissertation, 2002

HOCHLEITNER, KLAUS: Lateral Flow Rapid Tests: Material Selection, Material Properties and Basic Troubleshooting. In: INNOVABIOSCIENES (Veranst.): *Lateral Flow Assay Development*. <https://www.youtube.com/watch?v=HookT6FtQWU> , 05.11.2012 - webinar

HUECK, Christoph J.: Type III Protein Secretion System in Bacterial Pathogens on Animals and Plants. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2, Vol. 62 (1998), 379-433

ISBERG, R. R.; VOORHIS, D. L.; FALKOW, St.: Identification of Invasin: A Protein That Allows Enteritic Bacteria to Penetrate Cultured Mammalian Cells. In: *Cell*, Vol. 50 (1981), 769-778

JACKSON, David C.; FITZMAURICE, Catherine J.; BROWN, Lorena E.; ZENG, Weiguang: Preparation and properties of totally synthetic immunogens. In: *Vaccine* 18 (1999): 355-361

JEHANLI, A.: Antibody and Antigen Selection for Lateral Flow Assays. In: INNOVABIOSCIENES (Veranst.): *Lateral Flow Assay Development*. <https://www.youtube.com/watch?v=HookT6FtQWU>, 05.11.2012 - webinar

JONES K.D: Troubleshooting protein binding in nitrocellulose membranes Part 1: Principles. In: *IVD Technology* 5 (1999a), 32-41

JONES K.D: Troubleshooting protein binding in nitrocellulose membranes Part 2: Common problems. In: *IVD Technology* 5 (1999b), 26-35

KARPLUS, P. A.; SCHULZ, G. E.: Prediction of chain flexibility in proteins. In: *Naturwissenschaften* 72 (1985), 212-213

KATRIBE, Erin; BOGOMOLNAYA, Lydia M.; WINGERT, Heather ; ANDREWS-POLYMENIS, Helene: Subspecies IIIa and IIIb *Salmonellae* Are Defective for Colonization of Murine Models of Salmonellosis Compared to *Salmonella enterica* subsp. I Serovar Typhimurium. In: *Journal of bacteriology* Vol. 8 (2007), 2843–2850

KRÄMER, Johannes: *Lebensmittel-Mikrobiologie*. 4. Auflage. Stuttgart: Eugen Ulmer, 2002

KLEWITZ, Timo M.: *Entwicklung eines quantitativen Lateral-Flow-Immunoassays zum Nachweis von Analyten in geringsten Konzentrationen*. Hannover, Universität, Fachbereich Chemie, Dissertation, 2005

KUCZIUS, Thorsten: Die Detektion von Proteinen auf Membranen: Dot-Blot- und Western-Blot-Verfahren. In: REAM, Arnold M. und RAUCH, Peter (Hrsg.): *Immunoassays*. München: Spektrum Akademischer Verlag, 2007, 81-91

KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F.: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. In: *J Mol Biol*, Vol. 157 (1982), 105-132

LAEMMLI, U.K.: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), 680-685

LE MINOR, Leon; POPOFF, Michael Y.: Request for an opinion - Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the Type and Only Species of the Genus *Salmonella*. In: *Int J Syst Bacteriol* 4, Vol. 37 (1987), 465-468

LUTTMANN, Werner; BRATKE, Kai; KÜPPER, Michael; MYRTEK, Daniel: *Der Experimentator Immunologie*. 4. Auflage. Berlin: Springer, 2014

MANSFIELD, Michael A.: Nitrocellulose Membranes for Lateral Flow Immunoassays: A Technical Treatise. In: WONG, Raphael C.; TSE, Harley Y. (Hrsg.): *Lateral Flow Immunoassay*. New York: Humana Press, 2009, 95-114

MARK, Daniel; HAEBERLE, Stefan; ROTH, Günter; VON STETTEN, Felix; ZENGERLE, Roland: Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. In: *Chem. Soc. Rev.*, Vol. 39 (2010), 1153-1182

MAX RUBNER-INSTITUT (Hrsg.): *Nationale Verzehrsstudie II – Ergebnisbericht Teil 2*. Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel, 2008

MCGHIE, Emma J.; HAYWARD, Richard D.; KORONAKIS, Vassilis: Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin. In: *EMBO J.* 9, Vol. 20 (2001), 2131-2139

MDI MEMBRANE TECHNOLOGIES (Hrsg.): Frequently Asked Questions (FAQ's).
<http://www.mdimembrane.com/FAQs.html> (abgerufen am 01.09.2015)

MILLER, James: Interference in immunoassays: avoiding erroneous results. In: *Clinical Laboratory International* 28 (2004), 14-17

MILLIPORE™ (Hrsg.): *Rapid Lateral Flow Test Strips. Considerations for Product Development*. Millipore Corporation, 2008

MYENI, S. K.; ZHOU, D.: The C Terminus of SipC Binds and Bundles F-actin to Promote *Salmonella* Invasion. In: *J. Biol. Chem.* Vol. 285 (2010), 13357-13363

ODUMERU, J. A.; LEÓN-VELARDE, C. G.: *Salmonella* Detection Methods for Food and Food Ingredients. In: MAHMOUD, B. S. M. (Hrsg.): *Salmonella - A Dangerous Food-borne Pathogen*. InTech, 2012

O'FARRELL, Brendan: Evolution in Lateral Flow-Based Immunoassay Systems. In: WONG, Raphael C.; TSE, Harley Y. (Hrsg.): *Lateral Flow Immunoassay*. New York: Humana Press, 2009, 1-33

PARKER, J. M.; GUO, D.; HODGES, R. S.: New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. In: *Biochemistry*, Vol. 25 (1986), 5425-5432

PEGUES, David A.; MILLER, Samuel I.: *Salmonella Species, Including Salmonella Typhi*. In: MANDELL, Gerald L. ; BENNETT, John E. ; DOLIN, Raphael (Hrsg.): *Principles and Practice of Infectious Diseases – Vol. 1*. 7th edition. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2009

POSTHUMA-TRUMPIE, Geertruida A.; KORF, Jakob; van AMERONGEN, Aart: Lateral flow (immuno) assays: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. In: *Anal Bioanal Chem*, Vol 393 (2009), 569-582

RAEM , Arnold M; RAUCH, Peter (Hrsg.): *Immunoassays*. München: Spektrum Akademischer Verlag, 2007

RAUCH, Peter; ZELLMER, Angela; DANKBAR, Nico; SPECHT, Christoph; SPERLING, Detlef: Assayoptimierung: Störefekte bei Immunoassays erkennen und vermeiden. In: *Laborwelt* 4 (2005), 33-39

RKI (Hrsg.) : Salmonellose (Salmonellen-Gastroenteritis) – RKI-Ratgeber für Ärzte. Stand März 2015. http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Salmonellose.html (abgerufen am 28.08.2015)

RKI (Hrsg.) : Thypus abdominalis, Paratyphus – RKI-Ratgeber für Ärzte. Stand März 2015. http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Typhus_Paratyphus.html (abgerufen am 28.08.2015)

ROLLE, Michael., MAYR, Anton (Hrsg.): *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. 6. Auflage. Stuttgart: Enke Verlag, 1993

REEVES, Michael W.; EVINS Gracia M.; HEIBA, Anwar A.; PLIKAYTIS, Brian, D.; FARMER, J.J.: Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. In: *J Clin Microbiol* 27, Vol. 2 (1989), 313-320

SCHERER, Christina A.; COOPER, Emily; MILLER, Samuel I.: The Salmonella type III secretion translocon protein SspC is inserted into the epithelial cell plasma membrane upon infection. In: *Molecular Microbiology* 5, Vol. 37 (2000), 1133-1145

SCHNEIDER, Peter; MEYR, Marcus; SCHMUTZER, Roland; THAMM, Paul:
Troubleshooting bei der professionellen Entwicklung und Durchführung von ELISAs.
In: RAEM, Arnold M. ; RAUCH, Peter (Hrsg.): *Immunoassays*. München: Elsevier,
2007, 257-274

SCHUBERT-ULLRICH, Patricia; RUDOLF, Judith; ANSARI, Parisa; GALLER Brigitte;
FÜHRER, Manuela; MOLINELLI, Alexandra; BAUMGARTNER, Sabine: Commercialized
rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an over-
view. In : *Anal. Bioanal. Chem.* Vol. 395 (2009), 69-81

SCHUTZRECHT EP 1 913 394 B1 (2006)

SCHUTZRECHT WO/2007/016912 (2007),

SELBITZ, Hans-Joachim.; BISPING, Wolfgang: *Tierseuchen und Zoonosen – Alte und
neue Herausforderungen*. Jena: Gustav Fischer, 1995

SELBITZ, Hans-Joachim; SINELL, Hans-Jürgen.; SZIEGOLEIT, Andreas: *Das Salmonel-
len-Problem - VET-Special*. Jena: Gustav Fischer, 1995

SIFIN (Hrsg): *Fachinformation: Screening und Serotypisierung von Salmonellen mit
Testreagenzien überwiegend auf Basis monoklonaler Antikörper*, Sifin Institut für
Immunpräparate und Nährmedien GmbH, 2006

SRIKANTH, C.V.; MERCADO-LUBO, Regino; HALLSTROM, Kelly; MCCORMICK, Beth A.:
Salmonella effector proteins and host cell responses. In: *Cell. Mil. Life Sci.*, Vol. 68
(2011), 3687-3697

STRATMANN-SELKE, Janin; HOMUTH, Matthias; STRUTZBERG-MINDER, Katrin: *Noch ein
Salmonellen-ELISA? Salmonellen-Serodiagnostik und das DIVA-Konzept*. DVG Se-
rologie-Workshop , Erker, 12.-13.06.2008

STOSCHEK, Christa M.: Quantitation of protein. In: *Methods in Enzymology* 182
(1990), 50-68

SUÁREZ, Mónica; RÜSSMANN, Holger: Molecular mechanisms of Salmonella invasion: the type III secretion system of the pathogenicity island 1. In: *Internatl. Microbiol.*, Vol. 1 (1998), 197-204

TATE, Jill; WARD, Greg: Interferences in Immunoassay. In: *Clin Biochem Rev*, Vol. 25 (2004), 105-120

THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. (Hrsg.): *Pierce Western Blotting Handbook and Troubleshooting Guide*. Thermo Fisher Scientific Inc., 2014

TINDALL, B. J.; GRIMONT, P. A. D.; GARRITY, G.M.; EUZÉBY, J.P.: Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. In: *Int J Syst Evol Microbiol*, Vol. 55 (2005), 521-524

TISONE, Thomas C.; O'FARRELL, Brendan: Manufacturing the Next Generation of Highly Sensitive and Reproducible Lateral Flow Immunoassay. In: WONG, Raphael C.; TSE, Harley Y. (Hrsg.): *Lateral Flow Immunoassay*. New York: Humana Press, 2009, 131-156

WARSINKE, Axel: Point-of-care testing of proteins. In: *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol. 393 (2009), 1393-1405

WEBER, Herbert (Hrsg.): *Mikrobiologie der Lebensmittel – Grundlagen*. 9. Auflage. Hamburg: Behr's Verlag, 2010

WEINRAUCH, Yvette; DRUJAN, Doreen; SHAPIRO, Steven D.; WEISS, Jerrold; ZYCHLINSKY, Arturo: Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. In: *Nature*, 417 (2002), 91-94

WOOD, W Graham: "Matrix effects" in immunoassays. In: *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 205 (1991), 105-112

ZHANG, Gaiping; GUO, Junqing; WANG, Xuannian: Immunochromatographic Lateral Flow Strip Tests. In: RASOOLY, Avraham; HEROLD, Keith E. (Hrsg.): *Methods in Molecular Biology: Biosensors and Biodetection*. Humana Press, 2009, 169-183

ZIGANGIROVA, N.A.; NESTERENCO, L.N.; TIGANOVA, I.L.; KOST, E.A.: The Role of the Type-III Secretion System of Gram-Negative Bacteria in the Regulation of Chronic Infections. In: *Molecular Genetics, Microbiology and Virology* 2, Vol. 27 (2012), 91-102


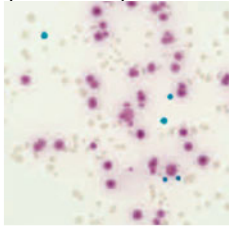



ZHOU, Daoguo; MOOSEKER, Mark S.; GALÁN, Jorge E.: Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. In: *Science* 26, Vol. 283 (1999), 2092-2095






10 Anhang






Anhang 1



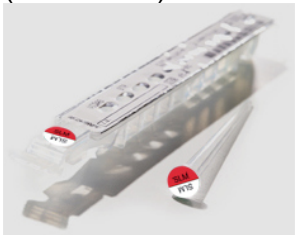
Tabelle 14: **Führende Konkurrenzprodukte/-verfahren**, internationaler Stand der Technik unter Angabe der technischen Daten im Vergleich mit den eigenen Entwicklungszielen

Testkit bzw. -verfahren (Hersteller)	Testprinzip	Testdauer, Einsatzgebiet
eigenes Verfahren:		
	<ul style="list-style-type: none"> - immunologisches Verfahren - Voranreicherung (18 ± 2 h), ggf. Probenvorbereitung und Kapillarmigrationstest ($15 \dots 30$ min) 	<ul style="list-style-type: none"> - ca. 21 h - Lebensmittel, Futtermittel und Umweltproben - alle Serovaren
klassisches Verfahren:		
Horizontales Verfahren 	<ul style="list-style-type: none"> - kulturelles Verfahren - bestehend aus Voranreicherung (18 ± 2 h), selektiver Anreicherung (24 ± 3 h), Ausstreichen auf festes Medium und Bebrütung (24 ± 3 h), Bestätigung auf festem Medium in Reinkultur (24 ± 3 h), biochemische und serologische Bestätigung (mind. 1 h, bei Differenzierung bis zum Serovar, Ausweitung auf mehrere Tage in Speziallaboren mgl.) 	<ul style="list-style-type: none"> - zeitintensiv (Dauer bis zum ersten Ergebnis: 66 h, bis zur endgültigen Bestätigung mind. 90 h) - materialaufwendig - klinische Diagnostik, Lebensmittel, Futtermittel und Umweltproben - alle Serovaren
schnellere, alternative Nachweisverfahren:		
MSRV-Medium (Fa. Heipha, Merck, Oxoid) 	<ul style="list-style-type: none"> - kulturelles Verfahren auf halbfestem Medium - basiert auf dem Nachweis der Beweglichkeit der Salmonellen auf einem halbfestem Medium - bestehend aus Voranreicherung (20 h), Bebrütung (24 ± 2 h) und biochemischer und serologischer Bestätigung (siehe klassisches Verfahren) 	<ul style="list-style-type: none"> - ca. 44 h bis zum ersten Ergebnis - nicht geeignet für unbewegliche Salmonellen - die Beweglichkeit nicht aller Salmonellen ist nach der Bebrütung ausgeprägt (besonders bei gestressten Bakterien) - serologische und biochemische Bestätigung nötig - Störeffekte bei der Agglutination durch Agartartikel - Medium muss immer frisch zubereitet werden - klinische Diagnostik, Lebensmittel, Futtermittel, Umweltproben - bewegliche <i>Salmonella</i> ssp.

Testkit bzw. -verfahren (Hersteller)	Testprinzip	Testdauer, Einsatzgebiet
Salmonella Precis (Oxoid) 	<ul style="list-style-type: none"> - kulturelles Verfahren auf chromogenem Medium - bestehend aus Voranreicherung (18 ± 2 h), Bebrütung (24 ± 2 h) auf Nähragar (positive Kolonien erscheinen in lila) und biochemischer und serologischer Bestätigung (siehe klassisches Verfahren) 	<ul style="list-style-type: none"> - 48 h - SP 92 %, SE 89,9 % - serologische und biochemische Bestätigung nötig - klinische Diagnostik, für Lebensmittel, Futtermittel und Umweltproben - alle Serovaren
Rapid Salmonella (Bio-Rad) 	<ul style="list-style-type: none"> - kulturelles Verfahren auf chromogenem Medium - bestehend aus Voranreicherung (18 ± 2 h), Bebrütung (24 ± 2 h) auf Nähragar (positive Kolonien erscheinen in magenta) und biochemischer und serologischer Bestätigung (siehe klassisches Verfahren) 	<ul style="list-style-type: none"> - 42 h - SP 94 %, SE 93 % - serologische und biochemische Bestätigung nötig - für Lebensmittel und Futtermittel - alle Serovaren
Simple method for Salmonella (SMS) (AES Chemunex) 	<ul style="list-style-type: none"> - kulturelles Verfahren auf chromogenem Medium - bestehend aus Voranreicherung (18 ± 2 h), Bebrütung (24 ± 1 h) auf Nähragar (Agar-Farbumschlag von grün zu rot) und biochemischer und serologischer Bestätigung (siehe klassisches Verfahren) 	<ul style="list-style-type: none"> - 48 h - SP 99 %, SE 98 % - serologische und biochemische Bestätigung nötig - für Lebensmittel und Futtermittel - bewegliche <i>Salmonella</i> ssp.
Impedanzverfahren (z.B. Gerät BacTrac, Fa. SY-Lab oder Malthus2000, Vertrieb IUL Instruments) 	<ul style="list-style-type: none"> - elektrische Messmethode mit speziellem Reader - Messung der durch den Stoffwechsel von Mikroorganismen erfolgte Änderung der Leitfähigkeit bzw. des Widerstandes 	<ul style="list-style-type: none"> - 34 h bis zum ersten Ergebnis - bei verdächtiger Kurve muss Bestätigung erfolgen - Lebensmittel und Futtermittel - alle Serovaren
GeneTrak Salmonella (Neogen, Vertrieb Fa. R-Biopharm) 	<ul style="list-style-type: none"> - molekularbiologisches Verfahren mittels Gensonde - Voranreicherung (24 h), Anreicherung in Tetrathionat- und Selenit-Bouillon (6 h), abschließende Anreicherung in GN-Bouillon (12-18 h), Probenvorbereitung und Messung im GeneTrak Photometer (2 h) 	<ul style="list-style-type: none"> - 42...48 h - keine Differenzierung mgl. - für Lebensmittel und Futtermittel - alle Serovaren

Testkit bzw. -verfahren (Hersteller)	Testprinzip	Testdauer, Einsatzgebiet
GeneDisc Salmonella (GENESYSTEMS) 	<ul style="list-style-type: none"> - molekularbiologisches Verfahren mittels PCR - Anreicherung in Peptonwasser (18 ± 2 h), Probenvorbereitung und Messung (ca. 1 h) 	<ul style="list-style-type: none"> - ab 18 h - SP 94,4 %, SE 94,1 % - keine Differenzierung mgl. - bei positivem Ergebnis Bestätigung notwendig - für Lebensmittel und Heimtierfutter - alle Serovaren
Q-Check Salmonella II (Bio-Rad) 	<ul style="list-style-type: none"> - molekularbiologisches Verfahren mittels PCR - Anreicherung in Peptonwasser (18 ± 2 h), Lyse, Amplifikation und Detektion (Fluoreszenzmessung) (21 ± 1 h) 	<ul style="list-style-type: none"> - 40 h - SP 98...100 %, SE 96...98 % - keine Differenzierung mgl. - Lebensmittel, Futtermittel, Umweltproben - alle Serovaren
TaqMan <i>Salmonella</i> PCR Amplification/Detection Kit (PE Applied Biosystems) 	<ul style="list-style-type: none"> - molekularbiologisches Verfahren mittels PCR - Anreicherung in Peptonwasser (16...24 h), Amplifikation und Detektion im selben Reaktionsgefäß (5'-Nuclease-Assey) (ca. 3 h) 	<ul style="list-style-type: none"> - ab 19 h - SP 99 %, SE 97 % - keine Differenzierung mgl. - Lebensmittel, Futtermittel - alle Serovaren
Bax System PCR Assay <i>Salmonella</i> (DuPont Qualicon) 	<ul style="list-style-type: none"> - molekularbiologisches Verfahren mittels PCR - Anreicherung in Peptonwasser (18 ± 2 h), Lyse, Amplifikation und Nachweis (4 h) 	<ul style="list-style-type: none"> - ca. 27 h - SP 99,6 %, SE 96,9 % - keine Differenzierung mgl. - Lebensmittel, Futtermittel und Umweltproben - alle Serovaren
Salmonella 1-2 Test (BioControl) 	<ul style="list-style-type: none"> - kulturelles Verfahren in zwei miteinander verbundenen Röhrchen (U-Röhrchen) - nach klassischer Voranreicherung (18 ± 2 h) Beimpfung eines der Röhrchen und Bebrütung mit Agglutinationsreaktion bei positivem Befund (14 – 30 h) 	<ul style="list-style-type: none"> - mind. 32 h - SP und SE 95...100 % - für Lebensmittel, Futtermittel, Umweltproben - bewegliche <i>Salmonella</i> spp.

Testkit bzw. -verfahren (Hersteller)	Testprinzip	Testdauer, Einsatzgebiet
Oxoid <i>Salmonella</i> Rapid Test (Oxoid) 	- immunologisches Verfahren - Kombination von Voranreicherung (18 ± 2 h), Bebrütung (24 h) und präsumtive Identifikation in einem einzelnen Kulturbedeälter	- ca. 42...44 h bis zum ersten Ergebnis - SE ca. 90 % - Bestätigung (serologisch) muss nachgeschaltet werden - keine direkte Differenzierung mgl. - für Lebensmittel- und klinische Proben - nicht geeignet für unbewegliche Salmonellen
Rapidyme <i>Salmonella</i> (Bio Art SA) 	- immunologisches Verfahren - Voranreicherung (18 ± 2 h), Anreicherung in Bouillon (24 ± 3 h), Extraktion und Sandwich-ELISA in der Mikrotiterplatte (ca. 2 h)	- 36...48 h - SP : 99,4 %, SE : 98,8 % - keine Differenzierung mgl. - für Lebensmittel und Futtermittel - alle Serovaren
Ridascreen <i>Salmonella</i> (R-Biopharm) 	- immunologisches Verfahren - Voranreicherung (18 ± 2 h), Anreicherung (4...6 h), Sandwich-ELISA in der Mikrotiterplatte (ca. 1 h 15 min)	- 24 h - SP 99 %, SE 98 % - Lebensmittel, Futtermittel und Umweltproben - alle Serovaren
Rayal <i>Salmonella</i> Optima (RayAL) 	- immunologisches Verfahren - Voranreicherung (18 ± 2 h), Anreicherung (18...24 h), Sandwich-ELISA in der Mikrotiterplatte (4 h)	- ab 40 h - SP 99,1 %, SE 99 % - für Lebensmittel, Futtermittel und Umweltproben - alle Serovaren
Singlepath <i>Salmonella</i> (Merck) 	- immunologisches Verfahren - Voranreicherung (18 ± 2 h), Anreicherung (24 ± 3 h), Probenvorbereitung und Kapillarmigrationstest (ca. 30 min)	- ca. 38 h - SP bis 100 %, SE bis 100 % - für Lebensmittel - ca. 110 Serovaren getestet

Testkit bzw. –verfahren (Hersteller)	Testprinzip	Testdauer, Einsatzgebiet
TECRA Salmonella Ultima (TECRA International) 	- immunologisches Verfahren - Voranreicherung (18 ± 2 h), Anreicherung (18...24 h), Sandwich-ELISA in der Mikrotiterplatte	- 36 h - SP 95...100 % - für Lebensmittel und Futter- mittel - alle Serovaren
Transia Plate Salmonella Gold (BioControl Systems) 	- immunologisches Verfahren Voranreicherung (18 ± 2 h), Anreicherung in Bouillon (24 ± 3 h), Extraktion und Sandwich- ELISA in der Mikrotiterplatte (ca. 2 h)	- 36 h (in Verbindung mit TAG24 Salmonella in 24 h) - SP 100 %, SE 99,5 % - Lebens- und Futtermittel, Umweltproben - alle Serovaren
VIDAS Salmonella ICS2 + SML (bioMérieux) 	- immunologisches Verfahren - Voranreicherung (18 ± 2 h), VIDAS ICS (40 min), ICS Bouillon (6...7 h), Enzyme Linked Fluorescent Immunoassay (ELFA) (ca. 1 h)	- 48 h - SP 99,4 %, SE 95,5 % - Lebensmittel (außer Roh- milch), Futtermittel - alle Serovaren

Anhang 2

Bei dem im Folgenden als H₂O bezeichneten Wasser handelte es sich um Aqua bidest.

Allgemein verwendete Puffer und Lösungen

Tabelle 14: **Zusammensetzung PBS, 10 x**

Substanz	Menge
NaCl	80,0 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	11,5 g
KCl	2,0 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
H ₂ O	ad 1000 ml

→ Einstellen des pH-Wertes auf 7,6 mit HCl

Die Stammlösung wurde vor Gebrauch 1:10 mit H₂O verdünnt und sterilfiltriert.

Tabelle 15: **Zusammensetzung PBS/T (PBS + Tween 20)**

Substanz	Menge
PBS	999,5 ml
Tween 20	0,5 ml

Tabelle 16: **Zusammensetzung TBS**

Substanz	Menge
NaCl	8,766 g
Tris	1,210 g
H ₂ O	ad 1000 ml

→ Einstellen des pH-Wertes auf 7,6 mit HCl

Tabelle 17: **Zusammensetzung TBS/T (TBS + Tween 20)**

Substanz	Menge
TBS	999,5 ml
Tween 20	0,5 ml

Tabelle 18: **Zusammensetzung WP**

Substanz	Menge
PBS 10x	100,0 ml
Tween 20	0,5 ml
H ₂ O	ad 1000 ml

Spezifische Puffer und Lösungen zur Proteinaufreinigung

Tabelle 19: **Zusammensetzung Citratpuffer (Protein A Säule)**

Substanz	Menge
NaCl	0,449 g
Citronensäuremonohydrat	0,289 g
H ₂ O	ad 50 ml

Tabelle 20: **Zusammensetzung Natriumhydrogencarbonatlösung, 1 M (Protein A Säule)**

Substanz	Menge
NaHCO ₃	0,84 g
H ₂ O	ad 10 ml

Tabelle 21: **Zusammensetzung Elutionspuffer (Glycin-HCL-Puffer), 0,15 M (SulfoLink®)**

Substanz	Menge
Glycin	1,12 g
H ₂ O	ad 100 ml

→ Einstellen des pH-Wertes auf 2,75 mit HCl

Tabelle 22: **Zusammensetzung Neutralisationspuffer (Tris-HCL-Puffer), 1 M (SulfoLink®)**

Substanz	Menge
Tris	12,114 g
H ₂ O	ad 100 ml

→ Einstellen des pH-Wertes auf 8,75 mit HCl

Tabelle 23: **Zusammensetzung PBS-1**

Substanz	Menge
PBS	999,5 ml
NaN ₃	0,5 ml

Spezifische Puffer, Lösungen und Gele für Dot Blot und Western Blot

Tabelle 24: **Zusammensetzung Blockierungslösung (Dot Blot)**

Substanz	Menge
Magermilchpulver	3 g
TBS	100 ml

Tabelle 25: **Zusammensetzung Blockierungslösung (Western Blot)**

Substanz	Menge
Magermilchpulver	3 g
WP	100 ml

Tabelle 26: **Zusammensetzung Antikörperpuffer**

Substanz	Menge
Magermilchpulver	1 g
TBS/T	100 ml

Tabelle 27: **Zusammensetzung Trenngelpuffer**

Substanz	Menge
Tris-HCL	18,1 g
H ₂ O	ad 100 ml

→ Einstellen des pH-Wertes auf 8,8 mit HCl

Tabelle 28: **Zusammensetzung Sammelgelpuffer**

Substanz	Menge
Tris-HCL	6 g
H ₂ O	ad 100 ml

→ Einstellen des pH-Wertes auf 6,8 mit HCl

Tabelle 29: **Zusammensetzung Gelfuß**

Substanz	Menge
Trenngelpuffer	500 µl
Acryl/Bisacrylamidlösung	500 µl
TEMED	5 µl
APS	5 µl

Tabelle 30: **Zusammensetzung Trenngel, 20 %ig**

Substanz	Menge
Acryl/Bisacrylamidlösung	6,670 ml
Trenngelpuffer	2,500 ml
H ₂ O	0,630 ml
SDS	0,100 ml
APS	0,100 ml
TEMED	0,004 ml

Tabelle 31: **Zusammensetzung Sammelgel, 5 %ig**

Substanz	Menge
H ₂ O	2,050 ml
Acryl/Bisacrylamidlösung	0,500 ml
Sammelgelpuffer	0,375 ml
SDS	0,030 ml
APS	0,015 ml
TEMED	0,005 ml

Tabelle 32: **Zusammensetzung Kathodenpuffer**

Substanz	Menge
Methanol	35 ml
H ₂ O	10 ml
Roti [®] -Blot K	5 ml

Tabelle 33: **Zusammensetzung Anodenpuffer**

Substanz	Menge
Methanol	35 ml
H ₂ O	10 ml
Roti [®] -Blot A	5 ml

Verwendete Medien

Tabelle 34: **Zusammensetzung Lactose Bouillon**

Substanz	Menge
Lactose-Bouillon, dehydriert*	13 g
H ₂ O	1000 ml

15 min bei 121 °C autoklaviert

*typische Zusammensetzung pro l: 3g Rindfleischextrakt („Lab Lemco“), 5 g Pepton, 5 g Lactose

Tabelle 35: **Zusammensetzung Casein-Soja-Pepton-Bouillon**

Substanz	Menge
Casein-Soja-Pepton-Bouillon, dehydriert*	30 g
H ₂ O	1000 ml

15 min bei 121 °C autoklaviert

*typische Zusammensetzung pro l: 17 g Casein (pankreasverdaut), 5 g NaCl, 3 g Soja (enzymatisch verdaut), 2,5 g KH₂PO₄, 2,5 g Glucose

Tabelle 36: **Zusammensetzung Nährbouillon**

Substanz	Menge
Nährbouillon, dehydriert*	13 g
H ₂ O	1000 ml

15 min bei 121 °C autoklaviert

*typische Zusammensetzung pro l: 5 g Pepton, 5 g NaCl, 2,5 g KH₂PO₄, 2,5 g Glucose, 2 g Hefeextrakt, 1 g Rindfleischextrakt („Lab Lemco“)

Tabelle 37: **Zusammensetzung gepuffertes Peptonwasser**

Substanz	Menge
gepuffertes Peptonwasser, dehydriert*	20 g
H ₂ O	1000 ml

15 min bei 121 °C autoklaviert

*typische Zusammensetzung pro l: 10 g Pepton, 5 g NaCl, 3,5 g Na₂HPO₄, 1,5 g KH₂PO₄

Tabelle 38: **Zusammensetzung Ringerlösung mit Brillantgrün**

Substanz	Menge
Ringer für ¼ starke Lsg., Tablette*	2 St.
Brillantgrün, 1 %	2 ml
H ₂ O	1000 ml

15 min bei 121 °C autoklaviert

*typische Zusammensetzung pro l: 2,25 g NaCl, 0,12 g CaCl, 0,105 g KCl, 0,05 g NaHCO₃

Tabelle 39: **Zusammensetzung Brillantgrün mit Wasser**

Substanz	Menge
Brillantgrün, 1 %	2 ml
H ₂ O	1000 ml

15 min bei 121 °C autoklaviert

Tabelle 40: **Zusammensetzung Magermilch mit Brillantgrün**

Substanz	Menge
Magermilchpulver-Lösung, 10 %*	1000 ml
Brillantgrün, 1 %	2 ml

5 min bei 121 °C autoklaviert

* Zusammensetzung nach AOAC official method 999.09 (2002): 100 ml Magermilchpulver, 1000 ml H₂O

Anhang 3

Bedienungsanleitung SulfoLink® Immobilization Kit for Peptides

INSTRUCTIONS

Thermo
SCIENTIFIC

SulfoLink® Immobilization Kit for Peptides

44999

1980.3

Number	Description
44999	<p>SulfoLink Immobilization Kit for Peptides, sufficient reagents to prepare five reusable affinity columns</p> <p>Kit Contents:</p> <p>SulfoLink Column, 5 × 2 ml, 6% crosslinked beaded agarose supplied as a 50% slurry in storage buffer (10 mM EDTA-Na, 0.05% NaN₃, 50% glycerol)</p> <p>Binding Capacity: ~2 mg sulfhydryl-containing peptide</p> <p>SulfoLink Coupling Buffer, 120 ml, 50 mM Tris, 5 mM EDTA-Na; pH 8.5</p> <p>Wash Solution, 120 ml, 1.0 M NaCl, 0.05% NaN₃</p> <p>L-Cysteine•HCl, 100 mg</p> <p>Bond-Breaker® TCEP Solution, Neutral pH, 0.5 ml, contains stabilized aqueous 0.5 M TCEP</p> <p>BupH™ Phosphate Buffered Saline Pack, 1 pack, yields 0.1 M phosphate, 0.15 M sodium chloride; pH 7.2, when reconstituted with 500 ml of water</p> <p>Column Accessories, porous discs (6), white tips (5), resin separator and column extender</p>

Storage: Upon receipt store product in the dark at 4°C. Product is shipped at ambient temperature.

Introduction

The SulfoLink Immobilization Kit for Peptides contains all the necessary components for covalent immobilization of sulfhydryl-containing peptides and other ligands to a beaded agarose support. The SulfoLink Coupling Resin is derivatized to contain iodoacetyl groups that react specifically with free sulfhydryls at pH 7.5-9.0 (Figure 1). This kit features a spin-column format that provides fast and easy immobilizations and purifications.

Peptides and other molecules for immobilization must have free (reduced) sulfhydryls. Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP), included in this kit, efficiently reduces peptides and other disulfide-containing molecules but does not interfere with iodoacetyl coupling. Phosphines are stable in aqueous solution, selectively reduce disulfide bonds and are essentially nonreactive toward other functional groups commonly present in peptides. TCEP is ideal for peptides and SulfoLink Chemistry because no removal of excess reagent is required before the immobilization reaction.

Once the peptide is immobilized on the SulfoLink Resin, the resulting affinity column can be used for antibody purification. The 12-atom spacer arm minimizes steric hindrance, ensuring efficient antibody-peptide binding interactions. Depending on the stability of the immobilized peptide, the column may be used multiple times without significant loss in binding capacity. The stability of the resin and covalent linkage allow researchers to use buffer conditions that are conducive to forming the desired interactions, making the the SulfoLink Immobilization Kit for Peptides an excellent versatile tool for protein research.

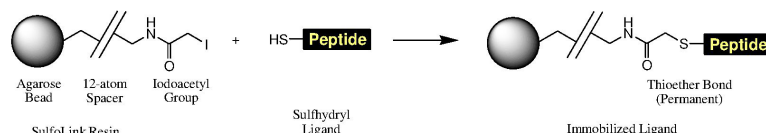


Figure 1. General structure and reaction scheme for the SulfoLink Coupling Resin.

Important Product Information

- Equilibrate kit components to room temperature before processing.
- To quantify the peptide and estimate coupling efficiency use a spectrophotometer or other suitable method. Please note that TCEP interferes with the Pierce® BCA™ Protein Assay.
- To determine if free sulfhydryls are available on the peptide, use Ellman's Reagent (Product No. 22582) according to the product instructions.
- Hydrophobic peptides may require additional wash steps or addition of detergent during coupling to minimize nonspecific binding.
- Peptides with an isoelectric point (pI) at or near the pH of the Coupling Buffer (pH 8.5) may not solubilize well. Determine the pI for your peptide (www.embl-heidelberg.de/cgi/pi-wrapper.pl) before dissolving it in the Coupling Buffer. Additives may assist in peptide solubility if necessary.
- Coupling Buffer pH may be modified only slightly because the reaction requires a degree of ionization of the target functional group. At high pH, undesirable reaction to amino groups can occur. In acidic conditions, reaction to the target sulfhydryls is poor. Therefore, immobilizations are best performed at pH 7.5-9.0.
- Hydrophobic peptides and other ligands may not be readily soluble in the Coupling Buffer. Water-miscible solvents are compatible with the coupling reaction at final concentrations up to 20%. The following solutions have been validated for use with this kit: 20% DMSO, DMF or ethanol; 1% Tween®-20; and 4 M urea.
- Particulate material in samples can impede column flow. Remove particulate by centrifugation (10,000 × g) or filtration (0.45 µm) before applying to the column.

Procedure for Peptide Immobilization

Note: Perform all centrifugations at 1,000 × g for 1 minute using a 15 ml collection tube.

A. Prepare the Sample for Coupling

1. Dissolve or dilute 0.1-1 mg peptide in 2 ml of Coupling Buffer. If peptide is oxidized, perform the TCEP reduction.
2. Add 0.1 ml TCEP (25 mM TCEP) to the 2 ml peptide in Coupling Buffer.
3. Incubate mixture at room temperature for 30 minutes. Equilibrate the SulfoLink Column during this incubation step.

B. Couple the Peptide to the SulfoLink Column

1. Suspend the SulfoLink Resin by mixing. Remove top cap and then bottom tab to avoid drawing air into the resin bed.
2. Centrifuge to remove the storage buffer.
3. Add 2 ml of Coupling Buffer and centrifuge. Repeat this step two times. Replace the bottom cap.
4. Add 2-3 ml of the sulfhydryl-containing peptide.
Note: Save 0.1 ml peptide to determine coupling efficiency.
5. Replace the bottom and top cap and mix by rocking or end-over-end mixing at room temperature for 15 minutes.
6. Place the column upright and incubate at room temperature for 30 minutes without mixing.
7. Remove top and bottom column caps, place column into a new tube and centrifuge to collect non-bound peptide.
8. Save the flow-through and determine the coupling efficiency while continuing the blocking step. Determine the coupling efficiency by comparing the peptide concentrations of the non-bound fraction to the starting sample and standards.
9. Wash the column with at least 2 ml of Wash Solution and centrifuge. Repeat this wash three times.
10. Wash the column with 2 ml of Coupling Buffer and centrifuge. Repeat this step once.

C. Block Nonspecific Binding Sites

1. Replace the bottom cap.
2. Add 15.8 mg L-Cysteine•HCl to 2 ml of Coupling Buffer (50 mM cysteine). Apply the cysteine solution to the column and replace the top cap.
3. Mix for 15 minutes at room temperature. Incubate the reaction without mixing for 30 minutes.
4. Sequentially remove the top and bottom caps and allow column to drain.
5. Either prepare the column for storage or proceed to the General Protocol for Affinity Purification Section.

D. Prepare Column for Storage

1. To equilibrate the column for storage, add 2 ml of degassed buffer (e.g., phosphate-buffered saline with optional 0.05% sodium azide) and centrifuge. Repeat this step three times.
2. Replace the bottom cap and add 2 ml of degassed buffer. Replace the top cap and store the column upright at 4°C, or remove the bottom cap and proceed with the General Protocol for Affinity Purification.

General Protocol for Affinity Purification

The following protocol details a spin-purification method; if desired, the traditional gravity-flow method can be used instead. The amount of protein sample that can be processed and the binding conditions required depend on the specific affinity interaction used and must be optimized for the particular experiment.

Note: For gravity-flow methods, a porous disc placed just above the resin bed automatically stops column flow when the solution has drained down to the top of the resin bed, preventing the column from drying. The disc also prevents resuspension of the packed bed when adding solution to the column. To insert the disc, use the open tube end of a resin separator to slide it to within 1 mm of the resin bed.

Materials Required

- Binding/Wash Buffer: Use phosphate-buffered saline (PBS; Product No. 28372), Tris-buffered saline (TBS; Product No. 28379) or other buffer that is conducive to forming the intended affinity interaction. Degas buffers to avoid introducing bubbles into the resin bed that may impede flow.
- Sample: Dissolve or exchange sample into Binding/Wash Buffer
- Elution Buffer: Pierce IgG Elution Buffer (Product No. 21004) or 0.1-0.2 M glycine•HCl at pH 2.5-3.0
- Neutralization Buffer (optional): Prepare 1 ml of 1 M sodium phosphate or 1 M Tris•HCl at pH 8.5-9.0

Method

Note: Perform all centrifugations at $1,000 \times g$ for 1 minute using a 15 ml collection tube.

1. Equilibrate the prepared affinity column to room temperature.
2. Remove top and bottom column caps. Centrifuge column to remove storage solution. Equilibrate column with 6 ml of Binding/Wash Buffer.
3. Add sample (≤ 2 ml) in appropriate binding buffer to the column. Allow sample to enter the resin bed and replace bottom cap. Add 0.2 ml of Binding/Wash Buffer. Replace top cap and incubate column at room temperature while rocking to allow binding to occur (e.g., 15-60 minutes). For samples > 2 ml, add volumes in succession or process sample by batch method.
4. Remove top and bottom caps and centrifuge column. Without changing collection tubes, add 1 ml of Binding/Wash Buffer and centrifuge again. Save the entire flow-through to evaluate binding efficiency and capacity.
5. To wash the resin, add 2 ml of Binding/Wash Buffer and centrifuge. Repeat this step 2-4 times.
6. Elute the protein with 2 ml of Elution Buffer collecting into a centrifuge tube containing 100 μ l of Neutralization Buffer and centrifuge. Save eluted, neutralized sample and repeat this step 2-3 times.
7. Use the protein directly for SDS-PAGE or analyze by protein assay. If required for the specific downstream assay or storage, perform a buffer exchange by dialysis or gel filtration.

Note: Equilibrate the column soon after use to prevent damage to the immobilized protein by the low pH Elution Buffer. Typically, an affinity column can be reused ~ 10 times, depending on the stability of the immobilized molecule.

8. To equilibrate column, apply 4 ml of Binding/Wash Buffer and allow it to flow through the column.
9. Cap the bottom and add 4 ml of Binding/Wash Buffer that contains a final concentration of 0.05% sodium azide for long-term storage. Cap the top and store column upright at 4°C. Do not freeze the resin.

Troubleshooting

Problem	Cause	Solution
Peptide precipitates in Coupling Buffer	Peptide is not soluble in Coupling Buffer	Dissolve peptide in a small amount of solvent and then add Coupling Buffer – see the Important Product Information and Additional Information Sections
Low coupling efficiency	Disulfide bonds formed with time	Reduce peptide with 1-50 mM TCEP
Affinity column has reduced binding capacity after several uses	Immobilized peptide was damaged by time, temperature or elution conditions	Prepare a new affinity column
	Binding sites and resin pores have become blocked with particulate or nonspecifically bound material	Remove precipitate from sample before affinity purification by centrifugation or 0.45 μ m filter Use nonionic detergent, high salt concentration, or other additives to reduce nonspecific binding or wash with greater stringency before elution

Additional Information Available from Web

- Tech Tip #12: Prepare molecules with poor solubility for immobilization on affinity supports
- Tech Tip #27: Optimize elution conditions for immunoaffinity purification
- Tech Tip #29: Degas buffers for use in affinity and gel filtration columns

Related Products

77720	Bond-Breaker TCEP Solution, Neutral pH, 5 ml
20401	SulfoLink Coupling Resin, 10 ml
28372	BupH Phosphate Buffered Saline Pack, 40 packs
22582	Ellman's Reagent, 5 g
44995	SulfoLink Immobilization Kit for Proteins

General References

Domen, P.L., *et al.* (1990). Site-directed immobilization of proteins. *J. Chromatogr.* **510**: 293-302.
 Lundblad, R.L. (1991). Chemical Reagents for Protein Modification, 2nd edition, CRC Press: Boca Raton, FL.
 Mettrione, R.M. (1982). Bromoacetyl Sepharose: A solid phase inhibitor of sulfhydryl enzymes. *Anal. Biochem.* **120**: 91-94.
 Wong, S.S. (1991). Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking. CRC Press: Boca Raton, FL, p. 248-251.

Product References

Handlogten, M., *et al.* (2005). Apical ammonia transport by the mouse inner medullary collecting duct cell (mIMCD-3). *Amer J Physiol-Renal* **289**:347-58.
 Narayan, S.B., *et al.* (2004). CLN3L, a novel protein related to the Batten disease protein, is overexpressed in Cln3^{-/-} mice and in Batten disease. *Brain* **127**:1748-54.
 Wilhelmsson, K., *et al.* (2004). Purification and identification of protein-tyrosine kinase-binding proteins using synthetic phosphopeptides as affinity reagents. *Mol Cell Proteomics* **3**:887-95.

This product ("Product") is warranted to operate or perform substantially in conformance with published Product specifications in effect at the time of sale, as set forth in the Product documentation, specifications and/or accompanying package inserts ("Documentation") and to be free from defects in material and workmanship. Unless otherwise expressly authorized in writing, Products are supplied for research use only. No claim of suitability for use in applications regulated by FDA is made. The warranty provided herein is valid only when used by properly trained individuals. Unless otherwise stated in the Documentation, this warranty is limited to one year from date of shipment when the Product is subjected to normal, proper and intended usage. This warranty does not extend to anyone other than the original purchaser of the Product ("Buyer").

No other warranties, express or implied, are granted, including without limitation, implied warranties of merchantability, fitness for any particular purpose, or non infringement. Buyer's exclusive remedy for non-conforming Products during the warranty period is limited to replacement of or refund for the non-conforming Product(s).

There is no obligation to replace Products as the result of (i) accident, disaster or event of force majeure, (ii) misuse, fault or negligence of or by Buyer, (iii) use of the Products in a manner for which they were not designed, or (iv) improper storage and handling of the Products.

Current versions of product instructions are available at www.thermo.com/pierce. For a faxed copy, call 800-874-3723 or contact your local distributor.

© 2007 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. Unless otherwise indicated, all trademarks are property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries. Printed in the USA.

Anhang 4

Die folgenden Tabellen geben die bereits korrigierten OD-Werte (Delta 450 nm – 630 nm) wieder. Der jeweilige Korrekturfaktor wird in der Tabellenüberschrift angegeben. Die grün markierten Werte können nach statistischer Auswertung gemäß Kapitel 4.2 als eindeutig positiv, die gelb markierten als fraglich gewertet werden.

Tabelle 41: **OD-Werte von *Salmonella* ser. Gallinarium und *Salmonella* ser. Typhimurium – 1. Messung**, Korrekturfaktor 1,005

	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8h	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h
LB	-0,021	-0,048	0,010	4,226	-0,037	-0,004	-0,012	0,091	0,090	0,089	1,312
Caso	-0,031	-0,008	-0,031	0,090	-0,019	-0,021	-0,015	0,053	0,034	0,088	4,261
NB	-0,027	-0,027	-0,029	4,128	-0,030	-0,030	-0,018	0,008	0,058	0,104	4,222
GPW	-0,010	-0,020	-0,002	4,162	-0,021	-0,017	0,002	0,023	0,043	0,085	4,228
RiB	-0,016	-0,033	-0,051	-0,030	-0,006	0,018	-0,008	0,002	0,003	0,018	0,018
WB	-0,028	0,009	-0,024	-0,055	-0,004	-0,003	-0,006	-0,013	-0,002	0,003	0,044
MMB	-0,019	-0,023	-0,033	-0,019	-0,001	0,002	0,000	0,001	0,004	0,270	0,053

Tabelle 42: **OD-Werte von *Salmonella* ser. Gallinarium und *Salmonella* ser. Typhimurium – 2. Messung**, Korrekturfaktor 1,012

	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8h	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h
LB	-0,017	-0,004	-0,004	4,160	-0,013	-0,006	0,005	0,028	0,081	-0,027	0,834
Caso	-0,011	-0,007	-0,008	0,046	-0,018	-0,017	-0,004	0,069	0,075	0,208	4,299
NB	-0,037	-0,020	-0,013	4,023	-0,005	0,006	-0,008	0,026	0,065	0,089	4,049
GPW	-0,007	-0,016	0,008	3,981	0,006	-0,020	-0,009	0,040	0,046	0,080	4,001
RiB	-0,008	-0,021	-0,031	-0,025	0,001	0,006	0,006	0,007	0,014	-0,016	-0,007
WB	-0,020	-0,015	-0,017	-0,037	-0,003	-0,019	-0,008	-0,018	0,013	-0,010	-0,001
MMB	-0,003	-0,034	-0,038	-0,023	0,007	0,000	0,006	-0,002	-0,015	-0,023	-0,012

Tabelle 43: **OD-Werte von *Salmonella* ser. Gallinarium und *Salmonella* ser. Typhimurium – 3. Messung**, Korrekturfaktor 0,989

	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8h	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h
LB	-0,029	-0,018	0,001	3,799	-0,011	-0,007	-0,005	0,038	0,066	0,060	1,237
Caso	-0,062	-0,043	-0,026	0,011	-0,014	-0,037	-0,008	0,044	0,035	0,133	0,137
NB	-0,003	-0,037	-0,012	4,018	-0,012	-0,020	-0,010	0,022	0,054	0,083	4,049
GPW	-0,015	-0,027	-0,004	3,778	-0,022	-0,015	-0,011	0,030	0,061	0,062	3,977
RiB	-0,021	-0,028	-0,032	-0,032	-0,011	-0,003	-0,002	-0,001	0,005	0,002	0,022
WB	-0,030	-0,025	-0,021	-0,027	0,000	0,005	0,003	-0,001	0,001	-0,027	0,003
MMB	-0,024	-0,033	-0,034	-0,034	0,001	-0,003	-0,005	-0,012	-0,006	-0,022	0,045

Tabelle 44: **OD-Werte von *Salmonella* ser. Senftenberg und *Salmonella* ser. Heidelberg – 1. Messung**, Korrekturfaktor 1,003

	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8h	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h
LB	0,013	-0,018	0,028	0,781	0,019	0,015	-0,003	0,200	0,058	0,189	0,747
Caso	0,034	0,136	0,232	4,180	0,017	0,010	0,021	0,627	0,548	0,532	0,620
NB	3,924	4,113	4,317	4,169	0,047	0,059	0,060	0,099	2,309	3,004	4,092
GPW	0,229	4,130	4,049	4,285	0,129	0,108	0,137	0,172	0,177	0,760	3,995
RiB	0,004	-0,056	-0,021	0,093	-0,029	-0,026	-0,019	-0,001	-0,025	0,002	-0,032
WB	-0,017	-0,039	-0,049	0,055	-0,016	-0,030	-0,027	-0,015	-0,015	-0,012	-0,016
MMB	-0,017	-0,047	-0,069	0,062	-0,034	-0,030	-0,019	-0,009	-0,049	-0,056	0,016

Tabelle 45: **OD-Werte von *Salmonella* ser. Senftenberg und *Salmonella* ser. Heidelberg**
– 2. Messung, Korrekturfaktor 1,006

	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8h	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h
LB	0,003	-0,018	0,015	0,809	0,009	-0,008	-0,004	0,195	0,089	0,053	0,868
Caso	0,033	0,132	0,239	4,286	0,014	0,011	0,014	0,691	0,637	0,656	0,614
NB	3,963	4,108	4,302	4,320	0,076	0,063	0,076	0,116	2,327	3,032	4,050
GPW	0,245	4,208	3,989	4,336	0,141	0,134	0,136	0,257	0,182	0,939	4,110
RiB	-0,005	-0,047	-0,020	0,109	-0,002	-0,038	-0,037	-0,027	-0,017	-0,014	-0,023
WB	-0,002	-0,033	-0,037	0,078	-0,018	-0,019	-0,013	-0,018	-0,010	0,007	0,002
MMB	-0,016	-0,030	-0,055	0,073	-0,020	-0,034	-0,041	-0,017	-0,020	-0,036	0,040

Tabelle 46: **OD-Werte von *Salmonella* ser. Senftenberg und *Salmonella* ser. Heidelberg**
– 3. Messung, Korrekturfaktor 0,994

	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8h	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h
LB	-0,026	-0,016	0,022	0,805	-0,006	-0,006	-0,011	0,177	0,087	0,045	0,963
Caso	0,036	0,120	0,225	4,339	0,013	0,008	0,015	0,684	0,719	0,609	0,596
NB	3,903	4,045	4,243	4,559	0,123	0,108	0,120	0,097	2,300	2,994	3,976
GPW	0,243	4,156	3,948	4,276	0,127	0,123	0,131	0,188	0,182	0,800	4,084
RiB	-0,028	-0,045	-0,036	0,051	-0,015	-0,021	-0,023	-0,005	-0,014	-0,015	-0,004
WB	-0,017	-0,037	-0,035	0,067	-0,018	-0,017	-0,031	-0,021	-0,020	-0,015	-0,014
MMB	-0,021	-0,041	-0,044	0,055	-0,024	-0,025	-0,032	-0,019	-0,019	-0,060	0,027

Tabelle 47: **OD-Werte von *Escherichia coli* und *Salmonella arizonae* ser. 51:z4,z23:- – 1. Messung**, Korrekturfaktor 1,007

	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8h	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h
LB	0,014	0,042	-0,003	1,497	0,002	0,014	0,011	0,018	-0,003	0,014	0,817
Caso	-0,006	-0,011	0,000	0,028	-0,032	-0,035	-0,026	-0,013	-0,033	-0,028	3,928
NB	0,086	0,030	0,020	0,166	0,015	0,022	0,022	0,012	0,138	3,767	4,145
GPW	0,041	0,019	0,025	0,382	-0,004	-0,009	-0,023	-0,019	0,003	0,385	4,315
RiB	-0,012	-0,022	-0,011	0,054	-0,034	-0,026	-0,032	-0,014	-0,029	-0,028	-0,031
WB	0,026	-0,022	-0,028	-0,026	-0,032	-0,042	-0,050	-0,021	-0,049	-0,041	-0,037
MMB	-0,006	-0,035	-0,014	-0,003	-0,025	-0,023	-0,030	-0,030	-0,028	-0,034	-0,035

Tabelle 48: **OD-Werte von *Escherichia coli* und *Salmonella arizonae* ser. 51:z4,z23:- – 2. Messung**, Korrekturfaktor 0,959

	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8h	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h
LB	-0,002	0,009	0,007	1,399	-0,003	0,000	-0,001	0,008	-0,002	-0,005	0,829
Caso	-0,014	-0,025	-0,019	0,032	-0,032	-0,024	-0,028	-0,016	-0,030	-0,030	3,606
NB	0,071	0,022	0,027	0,172	0,007	0,004	0,003	0,007	0,243	3,760	4,074
GPW	0,033	0,026	0,025	0,361	-0,017	-0,013	-0,010	-0,006	-0,016	0,372	4,389
RiB	-0,019	-0,026	-0,028	0,023	-0,034	-0,044	-0,031	-0,034	-0,032	-0,036	-0,040
WB	0,023	-0,026	-0,028	-0,033	-0,043	-0,043	-0,049	-0,027	-0,023	-0,043	-0,043
MMB	-0,010	-0,030	-0,019	-0,024	-0,039	-0,043	-0,037	-0,030	-0,044	-0,039	-0,045

Tabelle 49: **OD-Werte von *Escherichia coli* und *Salmonella arizonae* ser. 51:z4,z23:- – 3. Messung**, Korrekturfaktor 1,045

	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8h	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h
LB	0,028	0,034	0,032	1,667	0,015	0,012	0,033	0,016	0,015	0,011	0,859
Caso	0,011	0,004	0,001	0,067	0,000	0,004	-0,005	-0,001	0,004	-0,003	4,060
NB	0,057	0,050	0,056	0,265	0,045	0,037	0,050	0,032	0,267	4,380	4,887
GPW	0,056	0,056	0,054	0,427	0,001	-0,001	0,011	0,014	0,005	0,347	5,010
RiB	0,003	0,003	-0,011	0,033	-0,003	0,004	-0,006	0,002	-0,001	0,002	-0,013
WB	0,033	-0,012	-0,012	-0,015	-0,019	-0,018	-0,015	-0,009	-0,012	-0,019	-0,020
MMB	-0,013	-0,006	-0,006	-0,008	-0,011	-0,008	-0,009	-0,012	-0,012	-0,008	-0,015

Tabelle 50: **OD-Werte von *Yersinia pseudotuberculosis* und *Salmonella* ser. Choleraesuis – 1. Messung**, Korrekturfaktor 1,000

	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8h	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h
LB	-0,021	-0,010	0,185	0,072	-0,011	-0,004	-0,016	0,012	0,020	0,060	0,182
Caso	0,051	0,097	0,221	-0,008	0,031	0,040	0,037	0,054	0,055	0,078	0,704
NB	0,055	0,138	0,249	0,097	0,005	0,000	0,012	-0,005	0,009	0,145	4,258
GPW	0,002	0,120	0,937	0,214	0,017	0,015	0,004	0,054	0,024	0,152	4,308
RiB	-0,042	-0,041	-0,036	-0,040	-0,037	-0,044	-0,039	-0,009	-0,009	-0,002	0,005
WB	-0,039	-0,036	-0,043	-0,027	-0,040	-0,043	-0,039	-0,019	-0,016	-0,011	0,001
MMB	-0,006	-0,017	-0,002	-0,006	0,006	0,009	-0,002	0,010	0,040	0,014	0,028

Tabelle 51: **OD-Werte von *Yersinia pseudotuberculosis* und *Salmonella* ser. Choleraesuis – 2. Messung**, Korrekturfaktor 1,008

	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8h	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h
LB	-0,010	-0,012	0,089	0,044	-0,011	-0,008	-0,008	0,019	0,017	0,094	0,254
Caso	0,058	0,092	0,152	0,000	0,036	0,037	0,033	0,072	0,062	0,085	0,716
NB	0,072	0,138	0,162	0,083	-0,002	0,001	0,003	0,053	0,044	0,170	4,638
GPW	0,007	0,101	0,117	0,135	0,009	0,020	0,023	0,043	0,031	0,159	4,386
RiB	-0,040	-0,039	-0,044	-0,038	-0,042	-0,039	-0,039	-0,021	-0,005	0,003	0,005
WB	-0,041	-0,044	-0,042	-0,035	-0,039	-0,040	-0,037	-0,018	-0,011	-0,008	-0,005
MMB	-0,007	-0,013	-0,006	-0,003	0,006	0,012	0,016	0,020	0,030	0,027	0,036

Tabelle 52: **OD-Werte von *Yersinia pseudotuberculosis* und *Salmonella* ser. Choleraesuis – 3. Messung**, Korrekturfaktor 0,984

	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8h	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h
LB	-0,015	-0,009	0,091	0,081	-0,008	-0,015	-0,017	0,008	0,016	0,058	0,175
Caso	0,063	0,081	0,114	0,084	0,041	0,023	0,029	0,049	0,053	0,071	0,692
NB	0,066	0,092	0,127	0,143	-0,005	-0,007	-0,005	-0,010	0,013	0,140	4,200
GPW	-0,002	0,110	0,119	0,120	-0,005	0,011	0,016	0,050	0,020	0,146	4,248
RiB	-0,044	-0,048	-0,042	-0,046	-0,045	-0,042	-0,039	-0,013	-0,013	-0,007	0,002
WB	-0,045	-0,049	-0,043	-0,041	-0,045	-0,046	-0,041	-0,023	-0,020	-0,015	-0,003
MMB	0,003	-0,014	0,002	-0,010	-0,003	0,002	-0,004	0,007	0,038	0,012	0,022

Tabelle 53: **OD-Werte von *Citrobacter freundii* und *Salmonella* ser. Enteritidis – 1. Messung**, Korrekturfaktor 0,994

	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8h	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h
LB	-0,016	-0,010	-0,011	0,090	-0,015	-0,011	-0,012	-0,024	0,016	0,024	3,016
Caso	-0,001	-0,057	-0,028	0,074	-0,051	-0,037	-0,030	-0,048	-0,013	0,025	4,325
NB	0,073	0,031	-0,035	0,241	-0,011	-0,028	-0,023	-0,006	0,091	0,231	4,110
GPW	0,000	-0,014	0,000	0,412	-0,004	0,018	0,002	0,041	0,212	3,573	4,051
RiB	0,003	-0,037	-0,043	-0,052	-0,032	-0,026	-0,024	-0,027	-0,024	-0,017	-0,016
WB	-0,014	-0,064	-0,048	0,022	-0,049	-0,051	-0,047	-0,039	-0,037	-0,025	-0,042
MMB	-0,034	-0,042	-0,050	-0,071	-0,045	-0,042	-0,027	-0,057	-0,036	-0,026	0,310

Tabelle 54: **OD-Werte von *Citrobacter freundii* und *Salmonella* ser. Enteritidis – 2. Messung**, Korrekturfaktor 0,989

	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8h	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h
LB	-0,015	-0,019	-0,016	0,060	-0,012	-0,019	-0,017	0,014	0,028	0,017	3,235
Caso	-0,039	-0,049	-0,033	0,050	-0,033	-0,040	-0,030	-0,038	-0,020	0,026	4,338
NB	0,037	0,038	-0,002	0,246	-0,023	-0,026	-0,026	0,036	0,091	0,237	4,175
GPW	-0,004	0,000	0,009	0,393	-0,003	0,000	-0,002	0,047	0,232	3,624	4,147
RiB	-0,030	-0,028	-0,035	-0,044	-0,026	-0,028	-0,023	-0,018	-0,020	-0,021	-0,018
WB	-0,034	-0,050	-0,035	-0,026	-0,027	-0,053	-0,053	-0,046	-0,050	-0,035	-0,032
MMB	-0,027	-0,034	-0,042	-0,060	-0,047	-0,048	-0,042	-0,053	-0,044	-0,030	0,386

Tabelle 55: **OD-Werte von *Citrobacter freundii* und *Salmonella* ser. Enteritidis – 3. Messung**, Korrekturfaktor 1,011

	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8h	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h
LB	-0,003	-0,003	0,003	0,076	0,002	-0,003	-0,008	0,008	0,016	0,034	3,140
Caso	-0,047	-0,045	-0,033	0,069	-0,034	-0,031	-0,031	-0,038	0,017	0,028	4,454
NB	0,054	0,055	0,032	0,228	-0,016	-0,018	-0,022	0,036	0,084	0,239	4,316
GPW	-0,002	-0,003	0,009	0,513	0,026	0,013	0,008	0,057	0,313	3,568	3,907
RiB	-0,030	-0,037	-0,038	-0,032	-0,014	-0,016	-0,014	-0,023	-0,026	-0,018	-0,017
WB	-0,036	-0,036	-0,038	0,035	-0,045	-0,043	-0,036	-0,036	-0,034	-0,032	-0,022
MMB	-0,032	-0,037	-0,050	-0,055	-0,030	-0,031	-0,020	-0,042	-0,017	-0,017	0,329

Tabelle 56: **OD-Werte von *Shigella sonnei* und *Pseudomonas aeruginosa* – 1. Messung**, Korrekturfaktor 0,981

	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8h	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h
LB	0,001	0,052	0,055	0,297	0,025	0,017	0,007	0,051	0,081	0,104	0,541
Caso	0,113	0,261	0,485	0,712	0,012	0,034	0,029	0,057	0,063	0,078	0,364
NB	0,096	0,134	0,158	0,303	0,016	0,029	0,039	-0,018	0,047	0,008	0,294
GPW	0,047	0,087	0,135	0,539	0,054	0,048	0,038	0,100	0,118	0,128	0,495
RiB	0,016	0,013	-0,022	0,014	0,025	0,030	0,023	0,040	0,075	0,008	0,043
WB	-0,008	-0,033	-0,021	-0,034	-0,003	0,017	0,005	-0,014	0,001	0,011	0,000
MMB	-0,048	-0,072	-0,046	-0,044	0,013	0,004	0,013	0,035	0,000	0,018	0,076

Tabelle 57: **OD-Werte von *Shigella sonnei* und *Pseudomonas aeruginosa* – 2. Messung**, Korrekturfaktor 1,012

	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8h	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h
LB	0,008	0,014	0,041	0,286	0,029	0,012	0,022	-0,013	-0,006	0,057	0,461
Caso	0,270	0,302	0,465	0,649	0,025	0,021	0,026	0,013	0,012	0,073	0,403
NB	0,093	0,139	0,153	0,342	0,013	0,018	0,032	0,002	0,119	0,003	0,354
GPW	0,073	0,082	0,140	0,583	0,056	0,042	0,042	0,105	0,109	0,115	0,485
RiB	0,037	0,032	0,028	0,036	-0,240	0,070	0,055	0,101	0,094	0,105	0,052
WB	0,023	-0,010	-0,005	-0,089	0,024	0,022	0,008	-0,004	0,012	0,007	0,012
MMB	-0,041	-0,046	-0,029	-0,030	-0,006	0,000	0,016	0,041	-0,012	0,028	0,060

Tabelle 58: **OD-Werte von *Shigella sonnei* und *Pseudomonas aeruginosa* – 3. Messung**, Korrekturfaktor 1,012

	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8 h	0 KbE 8h	50 KbE 8 h	50 KbE 9 h	50 KbE 10 h	50 KbE 20 h
LB	0,017	0,069	0,072	0,321	0,029	-0,256	0,038	0,050	0,092	0,114	0,480
Caso	0,133	0,285	0,516	0,622	0,044	0,041	0,041	0,082	0,099	0,071	0,423
NB	0,113	0,152	0,179	0,319	0,025	0,033	0,039	-0,009	0,068	0,020	0,341
GPW	0,064	0,105	0,154	0,567	0,073	0,065	0,057	0,122	0,131	0,134	0,638
RiB	0,032	0,023	-0,007	0,026	0,012	0,022	0,021	0,093	0,090	0,071	0,075
WB	0,007	-0,019	-0,007	-0,020	0,008	0,001	0,024	0,002	0,008	0,001	-0,032
MMB	-0,035	-0,061	-0,040	-0,027	0,003	-0,002	-0,263	0,012	0,012	0,000	0,057

Anhang 5

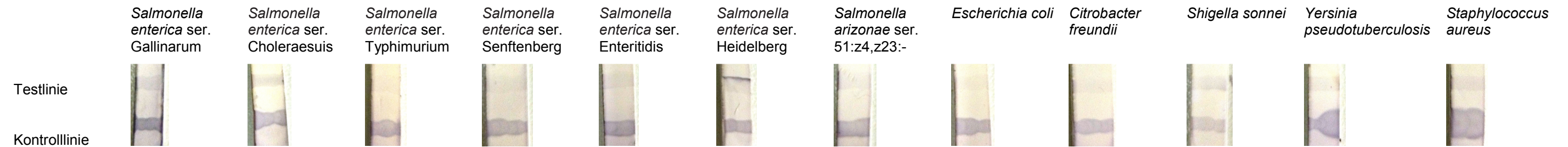


Abbildung 21: **Versuch 1, LFA mit Voranreicherungsbouillon unterschiedlicher Bakterien;** Testlinie (mAK gegen P1), AK-Gold-Komplex (mAK gegen P2), Kontrolllinie (Anti-Maus-IgG)

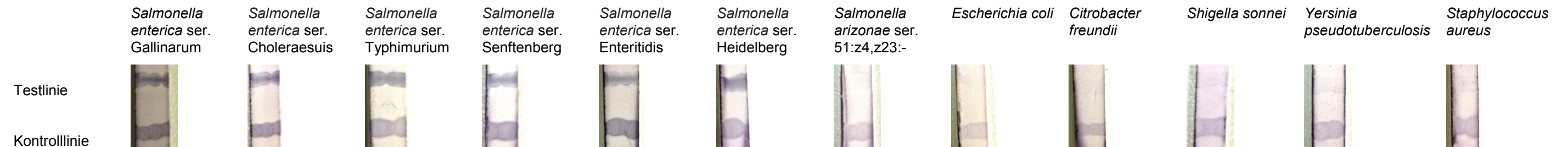


Abbildung 22: **Versuch 2, LFA mit Voranreicherungsbouillon unterschiedlicher Bakterien;** Testlinie (mAK gegen P1), AK-Gold-Komplex (mAK gegen P3), Kontrolllinie (Anti-Maus-IgG)

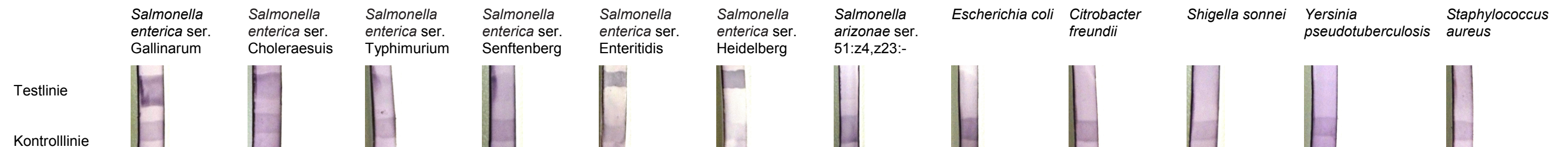


Abbildung 23: **Versuch 3, LFA mit Voranreicherungsbouillon unterschiedlicher Bakterien;** Testlinie (mAK gegen P1), AK-Gold-Komplex (mAK gegen SipC), Kontrolllinie (Anti-Maus-IgG)

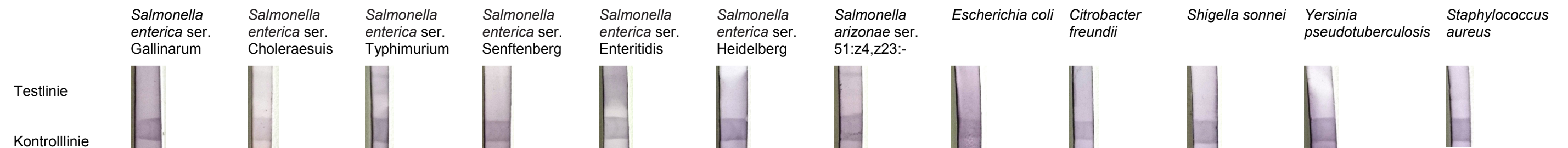


Abbildung 24: **Versuch 4, LFA mit Voranreicherungsbouillon unterschiedlicher Bakterien;** Testlinie (mAK gegen P2), AK-Gold-Komplex (mAK gegen P1), Kontrolllinie (Anti-Maus-IgG)

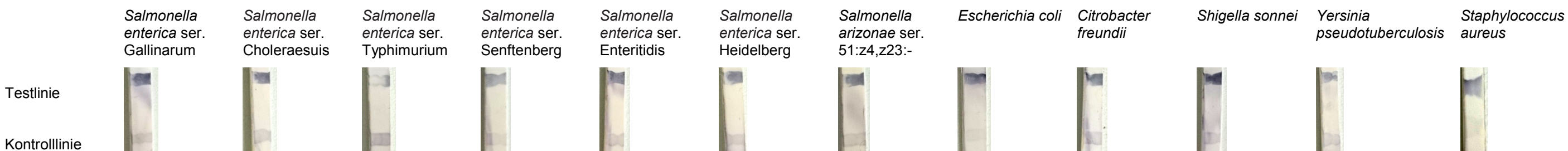


Abbildung 25: **Versuch 5, LFA mit Voranreicherungsbouillon unterschiedlicher Bakterien**; Testlinie (mAK gegen P2), AK-Gold-Komplex (mAK gegen P3), Kontrolllinie (Anti-Maus-IgG)

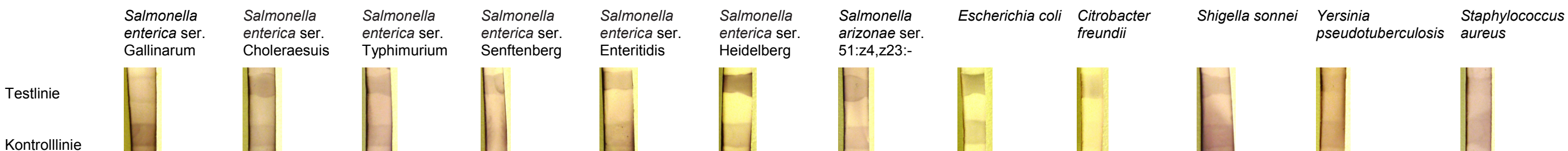


Abbildung 26: **Versuch 6, LFA mit Voranreicherungsbouillon unterschiedlicher Bakterien**; Testlinie (mAK gegen P2), AK-Gold-Komplex (mAK gegen SipC), Kontrolllinie (Anti-Maus-IgG)

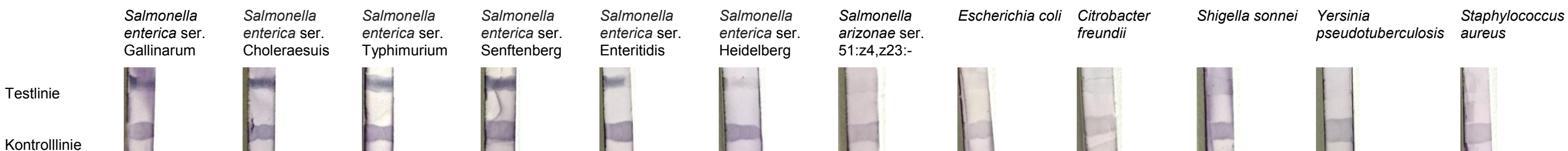


Abbildung 27: **Versuch 7, LFA mit Voranreicherungsbouillon unterschiedlicher Bakterien**; Testlinie (mAK gegen P3), AK-Gold-Komplex (mAK gegen P1), Kontrolllinie (Anti-Maus-IgG)

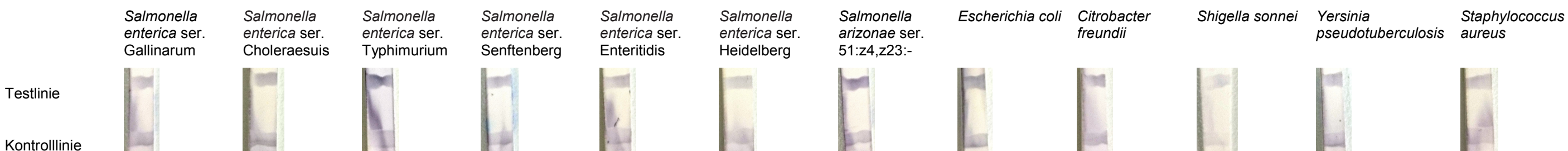


Abbildung 28: **Versuch 8, LFA mit Voranreicherungsbouillon unterschiedlicher Bakterien**; Testlinie (mAK gegen P3), AK-Gold-Komplex (mAK gegen P2), Kontrolllinie (Anti-Maus-IgG)

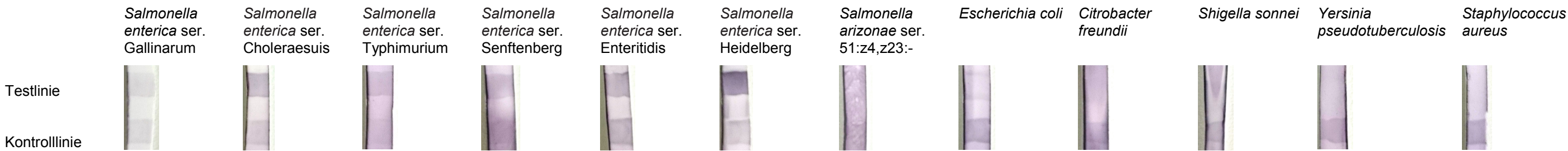


Abbildung 29: **Versuch 9, LFA mit Voranreicherungsbouillon unterschiedlicher Bakterien;** Testlinie (mAK gegen P3), AK-Gold-Komplex (mAK gegen SipC), Kontrolllinie (Anti-Maus-IgG)

Versuch Nr. 10 konnte auf Grund von Datenverlust nicht abgedruckt werden.

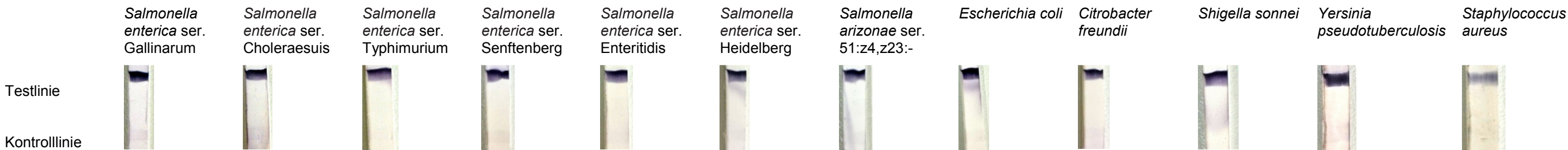


Abbildung 30: **Versuch 11, LFA mit Voranreicherungsbouillon unterschiedlicher Bakterien;** Testlinie (mAK gegen SipC), AK-Gold-Komplex (mAK gegen P2), Kontrolllinie (Anti-Maus-IgG)

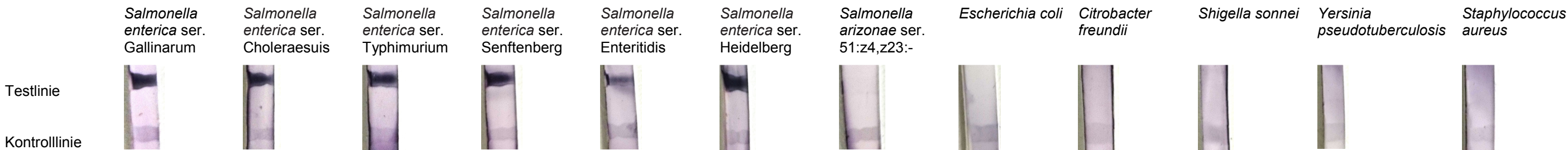


Abbildung 31: **Versuch 12, LFA mit Voranreicherungsbouillon unterschiedlicher Bakterien;** Testlinie (mAK gegen SipC), AK-Gold-Komplex (mAK gegen P3), Kontrolllinie (Anti-Maus-IgG)

Erklärung

Ich erkläre, dass die vorliegende Publikation selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst wurde.

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift

THESEN

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, einen zuverlässigen Test zum Nachweis von Salmonellen zu entwickeln. Es sollte ein Verfahren aufgebaut werden, das einen möglichst frühen Nachweis ermöglicht und alle wichtigen Serovaren erfasst. Dazu musste sich das Testsystem auf eine Eigenschaft von Salmonellen stützen, die allen Serovaren gemein ist.

1. Basis der vorliegenden Arbeit ist die Verwendung des SipC-Proteins zum Nachweis einer Salmonelleninfektion bzw. -kontamination. Dieses Effektorprotein wird beim Stoffwechsel von Salmonellen auch unabhängig vom Vorhandensein vor Wirtszellen ausgeschieden.
2. Die Sezernierung des SipC-Proteins in geeignete Voranreicherungsmedien erfolgt zu einem sehr frühen Zeitpunkt und kann bereits nach 10 h nachgewiesen werden.
3. Bei strukturanalytischer Betrachtung der Aminosäuresequenz des SipC-Proteins konnten 5 hochantigene Areale ermittelt werden. Identifiziert wurden folgende Aminosäuresequenzen:
 - Proteinabschnitt 363-378 mit der Sequenz VASTASDEARESSRKS
 - Proteinabschnitt 15-30 mit der Sequenz NNHSEVENSSQTASQSV
 - Proteinabschnitt 343-357 mit der Sequenz GQYAATQERSEQQIS
 - Proteinabschnitt 276-289 mit der Sequenz LGIKDSNKQISPEH
 - Proteinabschnitt 246-260 mit der Sequenz LNMKKTGTDATKNLN
4. Die Areale können zur Generierung von AK genutzt werden, die gegen folgende Peptidsequenzen gerichtet sind:
NH₂-VASTASDEARESSRKS-COOH,
NH₂-NNHSEVENSSQTASQSV-COOH,
NH₂-GQYAATQERSEQQIS-COOH,
NH₂-LGIKDSNKQISPEH-COOH
NH₂-LNMKKTGTDATKNLN-COOH

Nach Immunisierung von Tieren werden polyklonale und monoklonale Antikörper induziert, die SipC erkennen können.

5. Die gewonnenen polyklonalen oder monoklonalen Antikörper gegen die synthetisch hergestellten Peptide können einzeln oder in Kombination in immunochemischen Nachweissystemen verwendet werden.
6. Auf Basis der gewonnenen monoklonalen Antikörper kann ein Lateral Flow Assay aufgebaut werden, mit dem der Nachweis des SipC-Proteins aus Voranreicherungsmedien als Indikator für eine Salmonelleninfektion/-kontamination gelingt.